



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Andréia Carolinne de Souza Brito

Potencial terapêutico da pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção pelo
Trypanosoma cruzi

Rio de Janeiro

2020

Andréia Carolinne de Souza Brito

Potencial terapêutico da pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B862 Brito, Andréia Carolinne de Souza.
Potencial terapêutico da pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção pelo
Trypanosoma cruzi/ Andréia Carolinne de Souza Brito. – 2020.
119f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva.

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de
Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Quimioterapia - Teses. 3. Antiparasitários -
Teses. 4. Chagas, doença de - Teses. I. Silva, Sílvia Amaral Gonçalves da. II.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

CDU 616.937

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 – 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Andréia Carolinne de Souza Brito

Potencial terapêutico da pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 5 de agosto de 2020.

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira

Instituto de Biologia Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Alda Maria da Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que sem Ele não sou ninguém, aos meus pais, pelo amor incondicional. Eu não seria nada sem vocês. Ao meu irmão e minha cunhada, pela ajuda nos momentos onde me sentia incapaz.

À minha orientadora Silvia Amaral Gonçalves da Silva, pela oportunidade, por sempre acreditar na minha capacidade, pela paciência durante todos esses anos, que incluíram iniciação científica e o mestrado, pelos conselhos e cuidados maternos.

Aos professores da Disciplina de Parasitologia, Alexandre Bello, Eduardo Torres, Patricia Dutra, Renata Neves, José Roberto Machado, Alda da Cruz e aos técnicos Yara, Erika, Nádia, Jenif e Michely, que me auxiliaram na minha jornada acadêmica.

Aos alunos do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, Thayssa Silva, Bianca Ventura, Bruno Azevedo, Johnata, Kátia e Juliana, e aos técnicos Larissa Siqueira e Rosiane Freire que sempre me ajudaram nos experimentos do laboratório, me apoiaram, incentivaram, que me ensinaram a perfeita união entre trabalho amizade. A Rafaella Villarim, que a amizade ultrapassou as portas do laboratório.

Aos amigos que fiz no Laboratório Lacassas Porto e sempre me ajudaram em tudo que necessitava. Ao grupo do Laboratório de Interação Tripanossomatídeos e Vetores, que sempre me receberam muito bem.

À mestra Milla Paiva que foi responsável pelas análises histopatológicas.

Ao técnico Vinícios, do Departamento de Patologia, pelo auxílio na dosagem de citocinas.

À Dra. Patricia Dutra, Dra. Alda Maria da Cruz e Dr. Eduardo Santos por ter aceitado fazer parte da banca examinadora

À Dra Natália Nogueira por ter aceitado além da fazer parte da banca examinadora, aceitou também ser a revisora.

Ao Dr. Valter Viana e Dr. Edézio Cunha-Junior por terem aceitado serem suplente da banca examinadora.

À agencia de fomento CNPq.

A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar, fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar.

Henry Peter

RESUMO

BRITO, Andréia Carolinne de Souza. **Potencial terapêutico da pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção pelo *Trypanosoma cruzi***. 2020. 119 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e é endêmica na América Latina, sobretudo no Brasil. A terapêutica disponível para doença é muito limitada e apresenta eficácia apenas para os casos agudos da doença de Chagas. A pterocarpanoquinona LQB-118 apresenta atividade antitumoral e antileishmania. Estudos preliminares do nosso grupo indicaram que a LQB-118 apresenta atividade tripansomocida sobre amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (clone Dm28c), e *in vivo*, o tratamento pela via oral foi capaz de diminuir a parasitemia em camundongos *Swiss Webster* infectados com *T. cruzi* (cepa Y) e manter níveis de creatina quinase normais. O objetivo dessa tese foi avaliar o potencial terapêutico da LQB-118 na infecção experimental com *T. cruzi* (cepa Y), com ênfase na fase crônica da infecção. Epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram incubadas na presença ou não da LQB-118. *In vivo*, para a fase aguda, camundongos *Swiss Webster* foram infectados com 10^3 de tripomastigotas sanguíneos (cepa Y) via intraperitoneal e tratados pela via oral com LQB-118 (40 mg/Kg /dia), por 12 dias a partir de 4º dpi. Para a fase crônica, camundongos *Swiss Webster* foram infectados com 10^2 de tripomastigotas sanguíneos (cepa Y) via intraperitoneal e tratados pela via oral com LQB-118 (20 mg/Kg /2 x dia), por 15 dias a partir do 31º dpi. Foram avaliados a parasitemia, taxa de sobrevivência e histopatologia do coração. A LQB-118 demonstrou atividade inibitória sobre as três formas evolutivas do parasito, com IC₅₀ estimado em $1,82\mu\text{M} \pm 0,17$ (96h), $16,9\mu\text{M} \pm 1,6$ (24h) e $3,96\mu\text{M} \pm 1,06$ (48h) para epimastigota, tripomastigota e amastigota intracelular, respectivamente. *In vivo*, na fase aguda, a LQB-118 diminuiu a parasitemia no 11º e 12º dpi em 49,47% (p< 0,02) e 41,14% (p< 0,002), respectivamente, em relação ao grupo não tratado, com tendência a redução do número de ninhos de amastigotas, porém sem diferença no infiltrado inflamatório e na degradação de miócitos. Na fase crônica, não houve diferença na intensidade do infiltrado inflamatório no coração dos animais infectados tratados ou não com a LQB-118. Entretanto, houve uma redução de 34,6% de colágeno no tecido cardíaco dos animais tratados em comparação aos animais não tratados. A presença de parasito no tecido cardíaco foi rara, sendo observado em 22% (2/9) dos animais tratados com a LQB-118 e em 10% (1/10) dos animais não tratados. Nossos resultados indicam que a pterocarpanoquinona LQB-118 apresenta atividade *in vitro* contra o *T. cruzi* (cepa Y) e *in vivo* possui ação terapêutica promissora tanto na fase aguda como na crônica da doença de Chagas.

Palavras-chave: LQB-118. *Trypanosoma cruzi*. Fase aguda. Fase crônica. Quimioterapia.

Doença de Chagas.

ABSTRACT

BRITO, Andréia Carolinne de Souza. **Therapeutic potential of pterocarpanquinone LQB-118 in *Trypanosoma cruzi* infection.** 2020. 119 f. Tese (Doutoradoem Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and endemic in Latin America, especially in Brazil. The therapy available for the disease is very limited and present effective only for acute cases of Chagas disease. The pterocarpanquinone LQB-118 shows antitumor and antileishmanial activities. Preliminary studies in our group indicated that LQB-118 shows trypanosomicidal activity on intracellular amastigotes of *T. cruzi* (Dm28c) and *in vivo*, the oral treatment was able reduce parasitemia in mice infected with *T. cruzi* (Y strain) and maintain normal creatine kinase levels. The aim of this thesis was to evaluate the therapeutic potential of LQB-118 in *T. cruzi* (Y strain) experimental infection, with emphasis in the chronic phase of infection. Epimastigotes, blood trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi* (Y strain) were incubated in the presence or absence of LQB-118. In order to induce the acute phase *in vivo*, *Swiss Webster* mice were infected with intraperitoneally 10^3 bloodstream trypomastigotes and treated orally with LQB-118 (40 mg/Kg /day) for 12 days starting 4^o dpi. For the chronic phase, *Swiss Webster* mice were infected intraperitoneally with 10^2 bloodstream trypomastigotes with LQB-118 (20 mg/Kg /2 x day) for 15 days starting at 31^o dpi. Parasitemia, survival rate and histopathology of the heart were evaluated. LQB-118 demonstrated inhibitory activity on the three evolutionary forms of the parasite, with IC₅₀ estimated at $1.82\mu\text{M} \pm 0.17$ (96h), $16.9\mu\text{M} \pm 1.6$ (24h) and $3.96\mu\text{M} \pm 1.06$ (48h) for epimastigotes, bloodstream trypomastigotes and intracellular amastigotes, respectively. *In vivo*, in the acute phase, LQB-118 reduced the parasitemia in the 11th and 12th dpi by 49.5 % ($p < 0.02$) and 41.14%, respectively, in relation to the untreated group, with tendency to reduce the number of amastigote nests, but without difference in inflammatory infiltrate and myocyte degradation. In the chronic phase, there was no difference in the of the intensity inflammatory infiltrate in the heart of infected animals and treated or no with LQB-118. However, there was a reduce at 34.6% reduction of collagen in the cardiac tissue of treated animals in comparison to animals without treatment. The presence of parasites in the cardiac tissue of LQB-118-treated animal was rare, with 22% (2/9) for LQB-118-treated animals and at 10% (1/10) for untreated animals. Our results indicate that the pterocarpanquinone LQB-118 has trypanosomicidal activity against *T. cruzi* (strain Y) both *in vitro* and *in vivo* representing a promising therapeutic action in both the acute and chronic phases of Chagas disease.

Keywords: LQB-118. *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease acute phase. Chagas disease chronic phase. Chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 3 -	Distribuição dos casos da doença de Chagas em todo mundo com estimativas oficiais de 2018.....	28
Figura 4 -	Sinais de penetração do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 5 -	Radiografias do coração, esôfago e cólon, representando as formas clínicas da doença de Chagas na fase crônica.....	32
Figura 6 -	Estrutura química dos fármacos utilizados contra a doença de Chagas.....	35
Figura 7 -	Classificação das quinonas.....	41
Figura 8 -	Estrutura química da LQB-118.....	43
Figura 9 -	Desenho experimental da avaliação terapêutica da LQB-118 na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	51
Figura 10 -	Efeito da LQB-118 no crescimento de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
Figura 11 -	Efeito da LQB-118 sobre a motilidade de tripomastigotas sanguíneos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
Figura 12 -	Fotomicrografia de tripomastigotas sanguíneos de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por 24 horas com LQB-118.....	59
Figura 13 -	Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas intracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 14 -	Citotoxicidade do pterocarpanoquinona LQB-118 sobre macrófagos peritoneais de camundongos <i>Swiss Webster</i>	61
Figura 15 -	Efeito do tratamento com LQB-118 na parasitemia em animais na fase aguda da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
Figura 16 -	Avaliação quantitativa e semiquantitativa dos ninhos de amastigotas no coração em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118.....	63
Figura 17 -	Avaliação quantitativa e semiquantitativa do infiltrado inflamatório no coração em animais na fase aguda da infecção	

	tratados com LQB-118.....	64
Figura 18 -	Avaliação semiquantitativa dos componentes celulares do infiltrado inflamatório no coração em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118.....	64
Figura 19 -	Avaliação semiquantitativa da degeneração de miócitos em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118.....	65
Figura 20 -	Avaliação do percentual de colágeno no coração de animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118.....	66
Figura 21 -	Avaliação da parasitemia de camundongos <i>Swiss Webster</i> machos e fêmeas usando inóculos diferentes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
Figura 22 -	Avaliação do peso de camundongos <i>Swiss Webster</i> machos e fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
Figura 23 -	Avaliação da temperatura de camundongos <i>Swiss Webster</i> machos e fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
Figura 24 -	Avaliação da sobrevivência de camundongos <i>Swiss Webster</i> machos e fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
Figura 25 -	Peso relativo do coração, baço e fígado de camundongos <i>Swiss Webster</i> machos e fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
Figura 26 -	Aspecto físico dos camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas ao longo da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Figura 27 -	Peso corporal de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas ao longo da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Figura 28 -	Avaliação da sobrevivência de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas ao longo da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	78
Figura 29 -	Peso relativo do coração, baço e fígado de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	79
Figura 30 -	Perfil da curva de parasitemia de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	81
Figura 31 -	Avaliação do peso de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas submetidos ou não a infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratamento com LQB-118.....	82
Figura 32 -	Avaliação da temperatura corporal de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas submetidos ou não a infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> e	

	tratamento com a LQB-118.....	83
Figura 33 -	Fotografias dos camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
Figura 34 -	Avaliação da sobrevivência antes e durante o tratamento com LQB-118 nos animais infectados.....	85
Figura 35 -	Dosagem de citocinas no soro de camundongos <i>Swiss Webster</i> no início da fase crônica infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
Figura 36 -	Peso relativo do coração, baço e fígado de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	87
Figura 37 -	Avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório no coração de camundongos <i>Swiss Webster</i> tratados com LQB-118.....	88
Figura 38 -	Avaliação semiquantitativa dos componentes celulares do infiltrado inflamatório no coração de camundongos <i>Swiss Webster</i> tratados com LQB-118.....	90
Figura 39 -	Avaliação semiquantitativa da degeneração de miócitos no coração de camundongos <i>Swiss Webster</i> tratados com LQB-118.....	91
Figura 40 -	Avaliação semiquantitativa da congestão cardíaca no coração de camundongos <i>Swiss Webster</i> tratados com LQB-118.....	92
Figura 41 -	Avaliação do percentual de colágeno no coração de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com LQB-118.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características do Benznidazol e Nifurtimox.....	36
Tabela 2 -	Fármacos testados em fase clínica sozinhos ou em associação com Benznidazol.....	40
Tabela 3 -	Parasitemia de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectadas com diferentes inóculos de <i>T. cruzi</i>	76
Tabela 4 -	Parasitemia e mortalidade nas fases aguda e crônica da infecção.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosine triphosphate (Adenosina trifosfato)
AVC	Acidente Vascular cerebral
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
CBA	Cytometric Bed Array
DMSO	Dimethylsulfoxide (Dimetilsulfóxido)
DNA	Deoxyribonucleic acid ácido desoxirribonucléico)
DNDi	Drugs for Neglected Disease initiative
DTU	Discrete typing units (Unidades Discreta de Tipagem)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% do parasitos
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
kDNA	Kinetoplastid DNA (DNA do cinetoplasto)
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
LMC	Leucemia mielóide crônica
LQB	Laboratório de Química Biorgânica
MTT	brometo de 3-(4,5 dimetil-2 tiazolil)-2,5-difenil 2H-tetrazólio
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
nDNA	DNA nuclear
NTR	Nitroreductase
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampão Fosfato de Sódio/ Tampão fosfato salina)

ROS	Reactive oxygen species (Espécies Reativas de Oxigênio)
SFB	Soro fetal bovino
TcTOX	C9 cross-reactiveprotein
TNF	Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
XIAP	Inibidor de apoptose ligada ao X

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	44
1.1	Geral	44
1.2	Específico	44
2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	Considerações éticas	45
2.2	LQB-118	45
2.3	Parasito	45
2.4	Cultivo de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y)	46
2.5	Manutenção em camundongos e obtenção de tripomastigotas sanguíneos	46
2.6	Avaliação da atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
2.7	Avaliação da atividade da LQB-118 sobre tripomastigotas sanguíneos <i>in vitro</i>	47
2.8	Citotoxicidade da LQB-118 sobre macrófagos peritoneais murino	47
2.9	Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas intracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
2.10	Infecção de animais e grupos experimentais	49
2.10.1	<u>Animais</u>	49
2.10.2	<u>Grupos experimentais e tratamento com LQB-118 na fase aguda e crônica da infecção</u>	49
2.10.3	<u>Determinação da susceptibilidade entre macho e fêmea de camundongos <i>Swiss Webster</i> e estabelecimento da fase crônica da infecção</u>	50
2.10.4	<u>Avaliação da parasitemia e mortalidade</u>	52
2.10.5	<u>Avaliação clínica e comportamental</u>	52
2.10.6	<u>Dosagem de citocinas</u>	53
2.10.7	<u>Processamento das amostras de tecido para análise histopatológica</u>	53

2.10.8	<u>Análise histopatológica</u>	54
2.11	Análise estatística	55
3	RESULTADOS	56
3.1	Atividade <i>in vitro</i> da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
3.1.1	<u>Atividade da LQB-118 sobre o crescimento de epimastigotas</u>	56
3.1.2	<u>Atividade da LQB-118 sobre a motilidade de tripomastigotas</u>	57
3.1.3	<u>Atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares</u>	60
3.2	Citotoxicidade da LQB-118 sobre macrófagos	60
3.3	Efeito Terapêutico da LQB-118 em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	61
3.3.1	<u>Fase aguda</u>	61
3.3.2	<u>Fase crônica</u>	68
3.3.2.1	Determinação da susceptibilidade entre macho e fêmea de camundongos <i>Swiss Webster</i> para a infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> e estabelecimento da fase crônica.....	68
3.3.2.1.1	Perfil da curva de parasitemia entre os gêneros de camundongos <i>Swiss Webster</i>	68
3.3.2.1.2	Peso e temperatura corporal.....	70
3.3.2.1.3	Ensaio de Sobrevivência.....	72
3.3.2.1.4	Pesagem dos órgãos.....	74
3.3.2.2	Avaliação de parâmetros físicos, comportamentais e de sobrevivência de camundongos <i>Swiss Webster</i> fêmeas infectados com diferentes inóculos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
3.3.2.3	Tratamento de camundongos <i>Swiss Webster</i> com LQB-118 no início da fase crônica.....	79
3.3.2.3.1	Determinação do início da fase crônica antes do tratamento.....	80
3.3.2.3.2	Perfil da Curva de Parasitemia dos animais.....	80
3.3.2.3.3	Avaliação do tratamento com a LQB-118.....	81
3.3.2.3.4	Avaliação clínica.....	81
3.3.2.3.5	Avaliação da Sobrevivência.....	84
3.3.2.3.6	Dosagem de citocinas.....	85
3.3.2.3.7	Pesagem dos órgãos.....	87

3.3.2.3.8	Avaliação histopatológica do coração.....	88
4	DISCUSSÃO	94
	CONCLUSÕES	104
	REFERÊNCIAS	105

INTRODUÇÃO

Visão geral da doença de Chagas

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose do continente americano, causada pelo protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi* (REY, 2008; CORASSA et al., 2017; LIDANI et al., 2019). Dentre todas as doenças negligenciadas existentes no Brasil, a doença de Chagas é uma das maiores causadoras de mortalidade, tornando-se um grave problema de saúde pública. Entre os anos de 2008 a 2018 foram registrados 2.552 mil casos de doença de Chagas aguda no território brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a) e nesse mesmo período foram registrados 50.959 mil mortes correlacionadas com a doença de Chagas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Historicamente, há evidências da doença de Chagas em populações nativas da América (MELO, 2009), tendo sua expansão ocorrida na era pós-colombiana, devido as mudanças demográficas e ecológicas provocadas pelos conquistadores hispânicos e portugueses. Nas últimas décadas, quando a migração rural/urbana se intensificou em vários países, pessoas infectadas foram distribuídas para todas as regiões do mundo, principalmente a partir do segundo terço do século 20 (DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). Devido à emigração legal e ilegal de indivíduos infectados de países endêmicos da América Latina para países não endêmicos na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, esses migrantes criaram um novo problema epidemiológico e de saúde pública para os países que os receberam, como, riscos de transmissão por transfusão sanguínea ou congênita, necessidade de maior controle sobre doadores de sangue e cuidados médicos para pacientes em países com pouca experiência com a doença de Chagas (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

A história da descoberta da doença Chagas é considerada única nos anais da medicina. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas conduziu entre os anos de 1907 e 1909 o controle de malária na região de Lassance, em Minas Gerais. Foi quando identificou no tubo digestivo de hemípteros hematófagos, capturados em choupanas da área, um protozoário flagelado. Em 1909, descobriu seu primeiro caso em uma menina febril de 2 anos de idade, chamada Berenice. Posteriormente registrou mais 28 casos agudos e inúmeros casos crônicos da nova doença (revisto por DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). A grande capacidade de percepção de Carlos Chagas permitiu que ele conseguisse descrever em curto espaço de

tempo, o parasito (*T. cruzi*), seus reservatórios silvestres, seu desenvolvimento nos triatomíneos e as características clínicas da doença (ZINGALES, 2011).

A parasitose se origina de um ciclo primitivo do *T. cruzi*, que começou há milhões de anos com natureza eminentemente enzoótica, onde o parasito circulava entre vetores e reservatórios silvestres ao longo da maior parte do continente americano. A endemia se estabeleceu há cerca de 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, o que promoveu a adaptação dos triatomíneos, a um novo nicho, incluindo a alimentação do sangue humano e animais domésticos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; ZINGALES, 2011).

A doença de Chagas possui duas fases (aguda e crônica) e diferentes apresentações clínicas, com formas cardíacas, digestivas e cardiodigestivas. A cardiopatia inflamatória afeta, aproximadamente, 30% dos indivíduos infectados e, entre 5-10% podem desenvolver a forma digestiva. Porém, a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomático (cerca de 70%). As manifestações clínicas da doença e a suscetibilidade ao tratamento variam de acordo com a região (ZINGALES, 2011; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014).

Atualmente, os únicos medicamentos aprovados para o tratamento da doença de Chagas são o Benznidazol e o Nifurtimox, lançados no início de 1970. Ambos os medicamentos apresentam em comum a melhor tolerância em crianças pequenas e maior toxicidade em adultos, mais eficiência durante a fase aguda e a variação de suscetibilidade entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (FILARDI; BRENER, 1987; CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006; BERMUDEZ et al., 2016).

Trypanosoma cruzi

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da classe Kinetoplastidea, ordem Trypanosomatida e da família Trypanosomatiadae (D'AVILA-LEVY et al., 2015). A família Trypanosomatidae reúne grande número de espécies com características em comum, como a presença do cinetoplasto, que é constituído por uma rede fibrilar e compacta de DNA mitocondrial (kDNA) disposta em círculos, mitocôndria ramificada única e grande e de um único flagelo que emerge de um bolso anterior ou lateralmente, aderido ao corpo celular (REY, 2008).

Os tripanossomatídeos são considerados evolutivamente bem sucedidos, por se encontrarem em quase todo o planeta e pela capacidade de parasitar todos os grupos de vertebrados, vários invertebrados e plantas (LOPES et al., 2010). Nove gêneros são descritos nessa família, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Endotrypanum*, *Phytomonas*, *Trypanosomae* *Leishmania*. Desses gêneros, dois são formalmente descritos como capazes de parasitar o homem, o gênero *Trypanosoma* e o gênero *Leishmania* (LOPES et al., 2010; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013).

O gênero *Leishmania* apresenta diversas espécies que causam outra doença negligenciada, as leishmanioses tegumentares e a visceral. Eventualmente outros tripanossomatídeos são encontrados em coinfeção com *Leishmania* spp principalmente em indivíduos imunocomprometidos (KAUFER et al., 2017). Porém, recentemente, em humanos imunocompetentes com sintomas semelhantes à leishmaniose visceral, foi isolado um tripanossomatídeo com características moleculares correlacionadas ao gênero *Crithidia* e não com *Leishmania*, sendo denominada uma *Crithidia-like* (MARUYAMA et al., 2019).

Além da tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, o gênero *Trypanosoma* é também responsável pela tripanossomíase africana ou doença do sono, causada pelas espécies *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. Bruce irhodesiense* (MARKELL; JOHN; KROTOSKI, 2003; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013; KENNEDY, 2019).

A partir do sul dos Estados Unidos, México e se estendendo pela América Central e América do Sul até a Argentina, pode-se encontrar vários roedores silvestres, gambás e tatus infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. O gambá é um dos reservatórios mais importantes, uma vez que eles circulam entre o ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico em busca de alimentos. Carlos Chagas, em 1907 isolou o *T. cruzi* pela primeira vez em insetos reduvídeos *Conohinus megistus* (atualmente denominado *Panstrongylus megistus*) e mais tarde no homem em 1909 (CHAGAS, 1909; MARKELL; JOHN; KROTOSKI, 2003; ZINGALES, 2011). Para adaptar-se a diferentes situações bioecológicas em seus hospedeiros, o *T. cruzi* assumiu diferentes formas evolutivas, sendo as três principais: epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 1) (DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). Nos hospedeiros vertebrados encontram-se as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares, já no hospedeiro invertebrado encontram-se as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas.

Os tripanossomatídeos possuem a membrana celular muito parecida com a de outros eucariotos, porém, eles apresentam microtúbulos subpeculiares (principal componente do

citoesqueleto) interligados entre si e com a membrana plasmática (TEIXEIRA et al., 2011). O *T. cruzi*, por ser um parasito intracelular, é capaz de interagir inicialmente com as superfícies celulares do hospedeiro vertebrado e, em seguida, com a membrana do vacúolo parasitóforo, bem como com as células epiteliais do hospedeiro invertebrado. Para tal, uma grande variedade de moléculas são encontradas na superfície do *T. cruzi*, entre elas, inclui as mucinas, transialidase e a família da glicoproteínas Tc85 (SOUZA, 2009; LOPES et al., 2010; CHAIN et al, 2019). A membrana plasmática do *Trypanosoma cruzi* não é homogênea em relação a densidade e distribuição das moléculas intramembranosa. Pode-se definir três macrodomínios (corpo da célula, o flagelo e a bolsa flagelar) que por sua vez possuem microdomínios específicos como o colar flagelar (localizado na região basal do flagelo), a zona de ligação do flagelo ao corpo celular e a região do citóstoma (SOUZA, 2009; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2017).

O flagelo emerge a partir de um corpo basal no citoplasma por meio de uma proeminente invaginação da membrana (bolsa flagelar), sendo composto por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Essa estrutura está presente em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, porém, nas formas amastigotas, o flagelo é curto, não podendo ser visualizado em microscopia de luz. Essa estrutura é essencial a biologia do parasito no interior dos hospedeiros. O flagelo possui uma haste paraflagelar (estrutura fibrilar dentro do flagelo feita de uma matriz complexa de filamentos conectados ao axonema) altamente antigênica e fundamental para a sobrevivência do parasito (SOUZA, 2009; LOPES et al., 2010; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2017).

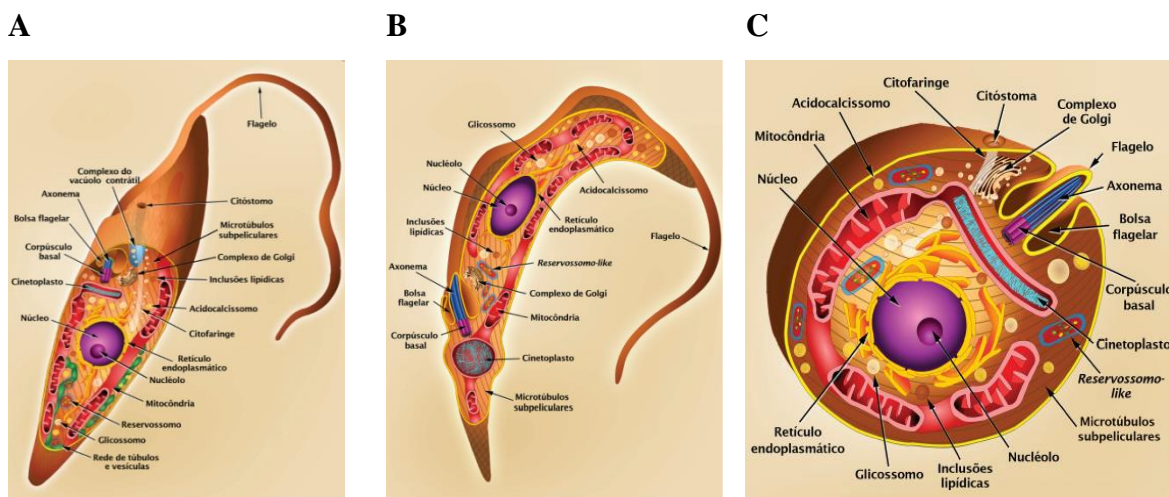
Os tripanosomatídeos apresentam mitocôndria única e altamente ramificada, onde se localiza uma estrutura específica desta ordem, o cinetoplasto. A maioria das proteínas mitocondriais são sintetizadas em ribossomos livres no citoplasma e em seguida, transportados para a organela. O cinetoplasto é uma estrutura que possui forma e organização estrutural que variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito, localizado perto do corpo basal. Estruturas filamentosas ligam o cinetoplasto ao corpo basal e por isso essa região define o local onde o corpo basal está localizado e a origem do flagelo (SOUZA, 2009; LOPES et al., 2010; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2017). Por ter características estruturais e funcionais distintas dos mamíferos, a mitocôndria desses parasitos é um alvo atraente para quimioterápicos (MENNA-BARRETO et al., 2009b).

Além das estruturas supracitadas, existem também os glicossomos que são encontrados em Kinetoplastea e Diplonemidae e são caracterizados por conter enzimas das vias glicolíticas e gliconeogênicas (SOUZA, 2009; LOPES et al., 2010; SOUZA;

CARVALHO; BARRIAS, 2017; QUIÑONES et al, 2020), os acidocalcissomos que estão envolvidos no armazenamento de cálcio, fósforo, sódio, potássio, ferro, zinco e magnésio, homeostase do pH e osmorregulação contrátil, os reservossomos que são o principal local de armazenamento de lipídeos e proteínas, degradação e reciclagem de proteínas (SOUZA, 2009; LOPES et al., 2010; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2017), além do vacúolo contrátil (fundamental no processo de regulação osmótica) e complexo de Golgi que se localiza próximo a bolsa flagelar (SOUZA, 2009; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2017).

Como mencionado anteriormente, o *T. cruzi* apresenta três principais formas evolutivas ao longo do seu ciclo dentro dos hospedeiros invertebrado e vertebrados. Os epimastigotas são formas muito móveis, com o cinetoplasto situado próximo ao núcleo e a bolsa flagelar apresenta-se lateralmente. O flagelo emerge longe da extremidade anterior, e mantém-se junto à membrana do citossomo por uma prega de bainha flagelar (membrana ondulante) e após ultrapassar o polo anterior da célula, torna-se livre. Essas formas são encontradas basicamente no tubo digestivo do inseto vetor e em meios artificiais de cultivo, onde se multiplicam por divisão binária (Figura 1A) (REY, 2008; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). Os tripomastigotas são formas infectantes, com corpo celular fusiforme e o cinetoplasto e a bolsa flagelar apresentam-se deslocados para a região entre o núcleo e a extremidade posterior. O flagelo é longo, emergindo do corpúsculo basal e percorrendo todo o corpo celular no sentido longitudinal, fazendo destacar-se uma membrana celular característica (membrana ondulante). São formas extracelulares, encontradas no sangue periférico do hospedeiro vertebrado e nas porções terminais do tubo digestivo e de Malpighi do inseto vetor (Figura 1B) (REY, 2008; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). Os amastigotas são formas de pequenas dimensões (4 μ m no maior diâmetro), contorno aproximadamente circular, ovóide ou fusiforme e sem flagelo exteriorizado. O corpo é achatado com núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico e o cinetoplasto bem visível. Essas formas são responsáveis pela multiplicação binária no hospedeiro vertebrado, onde subsistem exclusivamente no interior de diversos tipos celulares (Figura 1C) (REY, 2008, 2013; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013).

Figura 1 – Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: (A) Forma epimastigota; (B) Forma tripomastigota; (C) Forma amastigota. As formas estão em corte longitudinal mostrando as principais estruturas.

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA et al., 2011.

O *T. cruzi* é uma espécie heterogênea com alta diversidade genética e fenotípica (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Ao longo dos anos, várias abordagens tem sido usadas para caracterizar as populações do *T. cruzi*, definindo o número de subgrupos importantes. Esses subgrupos receberam diferentes designações, como: Zimodemas que baseavam-se na análise do perfil eletroforético de isoenzimas, revelando três grupos principais, mas com a análise de um número maior de loci genéticos em um maior número de isolados, a diversidade ampliou para 43 (ZINGALES, 2011); Esquizodemasque baseavam-se em populações que exibiam padrões de restrição de minicírculo de kDNA idênticos ou semelhantes (MOREL et al., 1980); Biodemasque baseavam-se em características biológicas das cepas naturais e o perfil histopatológico em animais experimentais (ANDRADE; MAGALHÃES, 1996). O consenso para a nomenclatura intraespecífica foi proposto em 2009 e reconheceu seis distintas DTU (*Discretetypingunits*), denominadas TcI a TcVI (ZINGALES et al., 2009). Atualmente uma sétima DTU restrita à morcegos é considerada, denominada Tcbat (MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2012; LIMA et al., 2015). As DTUs podem ser identificadas como um conjunto de marcadores genéticos para o acompanhamento epidemiológico (TIBAYRENC, 1998).

Em seres humanos, um amplo espectro de apresentações clínicas da doença de Chagas é observado, o que parece refletir a heterogeneidade entre as cepas de *T. cruzi* (revisado por ZINGALES, 2018), carga infecciosa, rota de infecção/ou diferenças genéticas da resposta

imune do hospedeiro (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001; revisado por ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ 2018).

Ciclo Biológico

O *Trypanosoma cruzi* exibe um ciclo biológico complexo com vários estágios de vida que se alternam entre o inseto vetor e hospedeiros mamíferos (Figura 2). Durante o hematofagismo, os vetores invertebrados (triatomíneos) do *T. cruzi* ingerem formas tripomastigotas sanguíneas do parasito presente na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. No estômago dos triatomíneos desencadeiam-se as primeiras diferenciações do parasito, formando as formas epimastigotas. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, alguns se movem para o intestino terminal e para os tubos de Malpighi. Na região do reto dos triatomíneos, após múltiplas rodadas de multiplicação, os epimastigotas aderem-se às células epiteliais e iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, processo esse denominado de metaciclo gênese (DUTRA et al., 2010; MACHADO et al., 2012; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013).

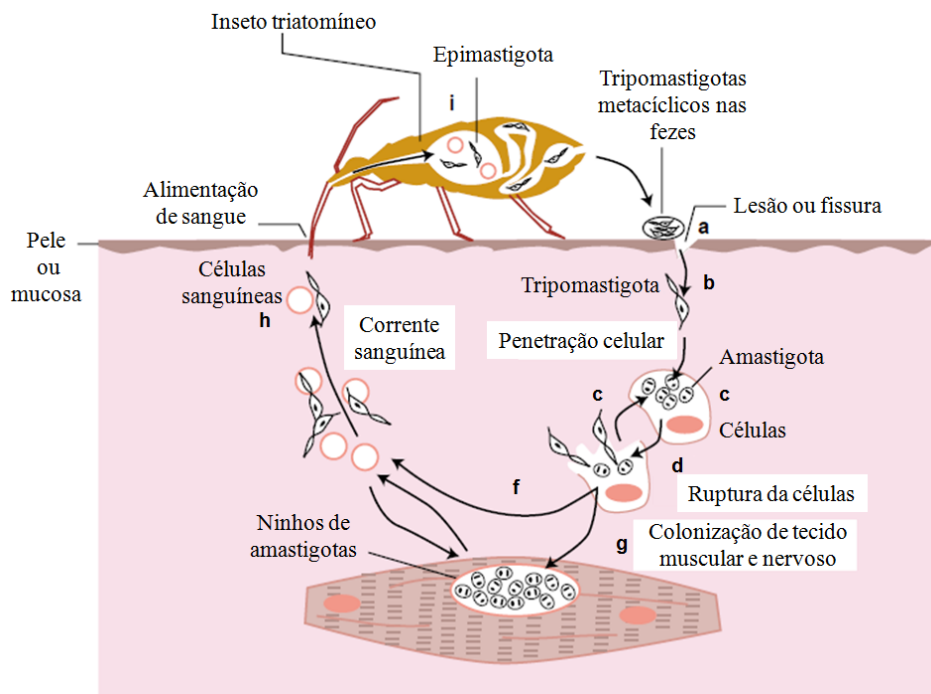
Os estímulos conhecidos para desencadear a diferenciação incluem a queda de pH abaixo de 5,5 e o estresse metabólico. Os tripomastigotas metacíclicos perdem aderência pelo epitélio intestinal, sendo liberados na luz intestinal (SILBER; FERREIRA, 2012) para as fezes e urina do inseto.

Durante e após o repasto sanguíneo, os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes e urina do triatomíneo, penetram pelo local da picada ou ainda por qualquer outra fissura ou lesão na pele (Figura 2). Uma vez ocorrida a penetração, os tripomastigotas metacíclicos aderem à membrana da célula hospedeira, iniciando o processo de penetração em um vacúolo derivado da própria membrana da célula hospedeira (vacúolo parasitóforo). Em resposta, a célula hospedeira recruta lisossomos perinucleares para o sítio de invasão, neste local, os lisossomos são incorporados ao vacúolo parasitóforo. Com a fusão dos lisossomos ao vacúolo parasitóforo, as formas tripomastigotas metacíclicas ficam expostas a um ambiente ácido, ativando a TcTOX (*porina-like*), que é responsável pela lise do vacúolo parasitóforo. Após a lise do vacúolo, o parasito escapa para o citoplasma, finalizando o processo de diferenciação da forma tripomastigota para amastigota, que foi iniciada em pH baixo no

interior do vacúolo (ANDREWS et al., 1990; DUTRA et al., 2010; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010).

Após um período de quietude, as amastigotas iniciam seu ciclo celular e passam por rodadas de replicação por divisão binária e, subsequentemente, se diferenciam em tripomastigotas levando à ruptura da célula hospedeira. Dessa forma, os tripomastigotas caem na corrente sanguínea ou invadem células de qualquer tecido ou órgão para a continuidade do ciclo. Qualquer célula nucleada de mamífero pode ser parasitada, dentre as quais se destacam cardiomiócitos, células musculares, células do sistema nervoso central e periférico, sistema retículo endotelial e tecido adiposo (ALVES; COLLI, 2007; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010; MACHADO et al., 2012; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). O ciclo se fecha quando um novo triatomíneo realizar o repasto sanguíneo no indivíduo infectado e ingerir formas tripomastigotas sanguíneas (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: O *T. cruzi* é naturalmente transmitido por inseto da triatomíneos. (a) Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca na pele do hospedeiro mamífero. (b) Os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes penetra pela pele com solução de continuidade quando o hospedeiro mamífero coça o local da picada. (c) Os tripomastigotas invadem as células locais e se diferenciam em formas amastigotas, que são formas intracelulares replicativas. Após a replicação, ocorre nova diferenciação para as formas tripomastigotas e rompimento da células. (d) Após a ruptura, os tripomastigotas são liberados e (e) infectam novas células. (f) Alguns tripomastigotas retornam para a corrente sanguínea ou (g) colonizam os tecidos muscular e neural. (h) Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectados, os insetos sugam os tripomastigotas sanguíneos. (i) No intestino

médio do inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que replicam por divisão binária e quando alcançam o reto, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, completando o ciclo.

Fonte: Adaptado de MACEDO; OLIVEIRA; PENA, 2002.

Transmissão

A transmissão do *T. cruzi* ocorre de diversos modos. A forma de maior importância epidemiológica é a vetorial, seguida de outras como a transmissão por via oral, transfusão sanguínea, congênita, transplante de órgãos, compartilhamento de agulhas (drogas injetáveis) e acidentes laboratoriais (DIAS; NETO, 2011; MARTINS-MELO et al., 2012).

A transmissão vetorial é o mecanismo de transmissão clássico do *T. cruzi*. Os vetores são os insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiro, bicho-de-parede, bicudo, chupão, chupança, entre outros. Eles apresentam ampla distribuição em diferentes ecótopos naturais de regiões tropicais e subtropicais (SILBER; FERREIRA, 2012; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013; REY, 2013). Os triatomíneos são hematófagos restritos, a maioria das espécies é silvestre e de hábitos noturnos (DUTRA et al., 2010; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). Existem reconhecidos 18 gêneros e 150 espécies de triatomíneos, das quais 135 espécies ocorrem exclusivamente no Continente Americano (GALVÃO, 2014; GORLA; NOIREAU, 2017), porém, apenas algumas são capazes de se infectar e transmitir o *T. cruzi*. As espécies de maior importância na transmissão da tripanossomíase americana para a população humana são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, e *Triatoma brasiliensis* (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; SILBER; FERREIRA, 2012; DIAS; BORGES-PEREIRA; MACEDO, 2013). Devido ao êxito no controle da transmissão da doença de Chagas por via vetorial, o Brasil, recebeu em 2006, a certificação da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, concedida pela Organização Panamericana da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A transmissão oral pode ocorrer quando animais susceptíveis ingerem o parasito infectante. Diversas situações podem proporcionar esse tipo de transmissão, tais como a ingestão de triatomíneos infectados ou de alimentos contaminados com suas fezes e/ou urina contendo tripomastigotas, canibalismos entre animais, e durante a amamentação. Atualmente, na região Norte do Brasil, a via oral tem grande importância, estando associada a microepidemias de forma aguda da doença de Chagas (LANA; TAFURI, 2011; MARTINS-

MELO et al., 2012; FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). Entre os anos de 1968 e 2007, foram registrados 592 casos de doença de Chagas na região amazônica brasileira, desses casos, 587 foram confirmados como doença de Chagas na fase aguda (MARTINS-MELO et al., 2012). A região Norte contribui com a maior proporção dos casos de transmissão oral entre os anos de 2000 e 2013 (91,1%), sendo o Pará, o estado que reúne a maior proporção dos casos 75% e mais de 50% apresentam início dos sintomas entre os meses de agosto e novembro, período que coincide com a safra de açaí no Pará (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Passos e colaboradores (2012) demonstraram que o *T. cruzi* consegue sobreviver por 144 horas à 4°C na polpa de açaí *in natura*, mostrando assim, a grande resistência desse parasito. Porém, a pasteurização ou branqueamento são métodos eficazes para a eliminação do parasito (BARBOSA et al, 2016; OLIVEIRA; SOCCOL; ROGEZ, 2019)

Outro mecanismo de transmissão importante é por via congênita, que ocorre quando existem ninhos de amastigotas na placenta, que posteriormente diferenciam e liberam tripomastigotas para a circulação fetal (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; LANA; TAFURI, 2011). Comumente, a infecção congênita por *T. cruzi* é assintomática, mas pode progredir para a doença de Chagas crônica com o passar dos anos. Entretanto, quando ocorre o tratamento da criança no primeiro ano de vida, pode haver cura efetiva (CARLIER et al., 2015). A infecção congênita por *T. cruzi* foi detectada em 4,1% (292/7086) e 4,3% (115/2691) das crianças na Bolívia e Paraguai, respectivamente, e em 6% (431/7188) das crianças na Argentina (CARLIER et al., 2015). Em uma revisão sistemática realizada por Martins-Melo e colaboradores (2014) entre os anos de 1984 e 2009, foi estimada que a taxa de transmissão congênita no Brasil seria de 1,7%. A transmissão congênita também foi registrada em países não endêmicos em consequência da migração de gestantes infectadas oriundas da América Latina (CARLIER et al., 2015). Em 18 estudos realizados na Espanha, das 743 crianças nascidas de mães infectadas, em 32 houve a transmissão do *T. cruzi* (4,3%) (HOWARD et al., 2014).

A transfusão sanguínea é um importante mecanismo de transmissão do *T. cruzi*, sobretudo para a urbanização da doença de Chagas no Brasil e em outros países endêmicos (DIAS et al., 2016). O risco após uma transfusão está entre 10-20% dependendo de fatores como, concentração tripomastigotas no sangue do doador, componentes do sangue transfundido e cepa do parasito (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; LANA; TAFURI, 2011). Em países endêmicos, a transfusão sanguínea já foi considerada a segunda forma mais comum de se adquirir a infecção, mas com a triagem obrigatória nos bancos de sangue, o

risco de transmissão por esta via foi significativamente reduzido em nosso país. No entanto em muitos países endêmicos não há um triagem obrigatória e esse controle em relação aos doadores é limitado, o que mantém essa via de transmissão importante (ANGHEBEN et al., 2015; COURA, 2015). Na última década, países não endêmicos como Canadá, Espanha, França, Estados Unidos da América, entre outros, estão introduzindo estratégias de triagem através de questionário (incluindo perguntas sobre nascimento, residência e transfusão de países endêmicos) e teste de anticorpos para *T. cruzi* (ANGHEBEN et al., 2015; DIAS et al., 2016).

A transmissão do *T. cruzi* via transplante de órgãos tem sido bem documentada na América Latina e em áreas não endêmicas, como algumas regiões dos Estados Unidos, Canadá e partes da Europa. Essa via de transmissão pode desencadear a fase aguda grave, pois os receptores dos órgãos precisam fazer uso de medicamentos imunossupressores, tornando-o mais suscetíveis à infecção (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; LANA; TAFURI, 2011).

A transmissão sexual é uma via hipotética em humanos, porém estudos experimentais em camundongos demonstram o potencial de transmissão sexual do *T. cruzi* durante a infecção aguda (MARTIN et al., 2015; RIOS et al., 2018) e infecção crônica (RIBEIRO et al., 2016). Em estudos realizados com quatro famílias paraenses, 82,6% das amostras de sêmen revelaram bandas específicas de nDNA⁺ (DNA nuclear) e kDNA⁺ (DNA do cinetoplasto) de *T. cruzi*. Além disso, a infectividade do *T. cruzi* do ejaculado de um paciente portador de Chagas que apresentou resultado positivo em ensaios de nDNA, mas sem anticorpos específicos, foi avaliada injetando o sêmen por via intraperitoneal em camundongos machos e pela infusão de uma quantidade igual de sêmen na vagina de camundongos fêmeas. Após cinco semanas foram detectados ninhos de amastigotas no coração e músculo esquelético dos camundongos infectados, além de parasitos presentes no lúmen do ducto deferente e tubo uterino (ARAUJO et al., 2017). Embora sejam necessários mais estudos, esses dados demonstram que a transmissão do *T. cruzi* por via sexual é uma possibilidade e que pode apresentar relevância epidemiológica em regiões não endêmicas.

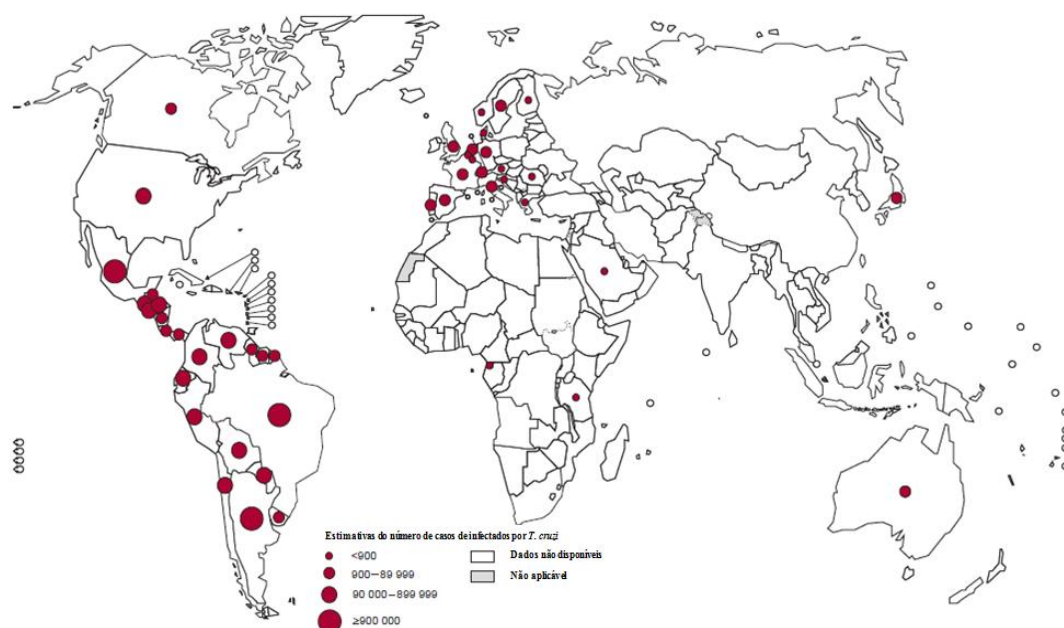
Epidemiologia

Cerca de 100 milhões de pessoas vivem em regiões onde os triatomíneos são detectados. A doença de Chagas é transmitida desde o sul do Texas (EUA) (GUNTER et al., 2017), passando pelo México, América Central e América do Sul, incluindo países como Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru, Argentina e Chile (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; ZINGALES, 2018).

Na década de 1980, o número de indivíduos infectados com *T. cruzi* em áreas endêmicas na América Latina foi estimado entre 16 a 18 milhões. Após a implantação de diversos programas de controle de vetores do parasito e rastreamento de bancos de sangues em regiões endêmicas, houve declínio da prevalência de doença Chagas para cerca de 11 milhões de casos no final de 1990 e 7,6 milhões de casos em 2006 (MCGRATH; FRAME; PALIS, 2015). Atualmente, estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, sendo a maioria na América Latina (Figura 3) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

Por muitas décadas a doença de Chagas foi considerada uma doença de áreas rurais, porém com migrações rural-urbana nos últimos anos, o padrão epidemiológico mudou. A doença de Chagas também é uma doença emergente em países não endêmicos, devido a migração de milhares de indivíduos infectados, muitos deles assintomáticos (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010). A transfusão sanguínea e o transplante de órgãos oriundos de indivíduos infectados são apontados como principais mecanismos de transmissão do parasito em países não endêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Figura 3 - Distribuição dos casos da doença de Chagas em todo mundo com estimativas oficiais de 2018



Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a

No Brasil, apenas a doença de Chagas aguda era de notificação compulsória, imediata (em até 24 horas) para a Secretária Estadual de Saúde e para a Secretária Municipal de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a), porém em 2020 foi incluída a doença de Chagas crônica entre as enfermidade de notificação compulsória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020c). Essa inclusão foi extremamente importante já que, somente uma pequena parcela das pessoas infectadas são diagnosticadas na fase aguda, pois como a maioria é assintomática ou oligossintomática (revisado por PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018), o que limita as chances de diagnóstico nessa fase da infecção e, conseqüentemente, o número de casos novos seria subestimado.

Aproximadamente 12% da população do Brasil vive em áreas endêmicas e a prevalência nacional é estimada em 1,0% (STANAWAY; ROTH, 2015). No ano de 2015, o Ministério da Saúde emitiu um boletim epidemiológico dos casos de doença de Chagas aguda e da distribuição dos triatomíneos no Brasil entre os anos de 2000 e 2013. Nesse boletim observou-se que a transmissão oral foi a mais frequente (68,9%) em todos os anos. Como mencionado anteriormente, a região Norte contribui com a maior número dos casos de transmissão oral (91,1%), sendo o Pará, o estado que reúne a maior proporção dos casos (75%). Deste total, mais de 50% dos casos apresentam início dos sintomas agudos entre os

meses de agosto e novembro, período que coincide com a safra de açaí (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Apesar de o Brasil ter recebido em 2006 a certificação da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, entre os anos de 2000 a 2013, 6,4% dos registros foi relativo a forma vetorial de transmissão. Em relação à transmissão congênita, 50% dos registros ocorreram no estado do Rio Grande do Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em um outro Boletim epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde em 2016, sobre "Indicadores de Vigilância em Saúde descritos segundo a variável raça/cor", estima-se que existam, no Brasil, cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas, predominando os casos crônicos decorrentes da infecção por via vetorial em décadas anteriores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Esse valor (4,6 milhões) equivale a mais da metade do número de indivíduos infectados no mundo, que é de 6 a 7 milhões (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

A Argentina tem a maior prevalência da doença de Chagas entre os países do sul da América Latina, onde 18,8% da população vive em áreas endêmicas e a prevalência é estimada em 4,1%. Porém muitos estudos relatam que em algumas comunidades a prevalência seja superior a 25%, como por exemplo na província de Chaco a prevalência foi estimada em 53% (STANAWAY; ROTH, 2015).

Atualmente, 16 países na região das Américas são considerados de transmissão vetorial interrompida em nível nacional ou em parte de seu território, entre eles estão Chile (1999), Uruguai (1997-2012), Guatemala (2008), El Salvador (2010), Honduras (2010), Nicarágua (2010) e Paraguai (2018) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

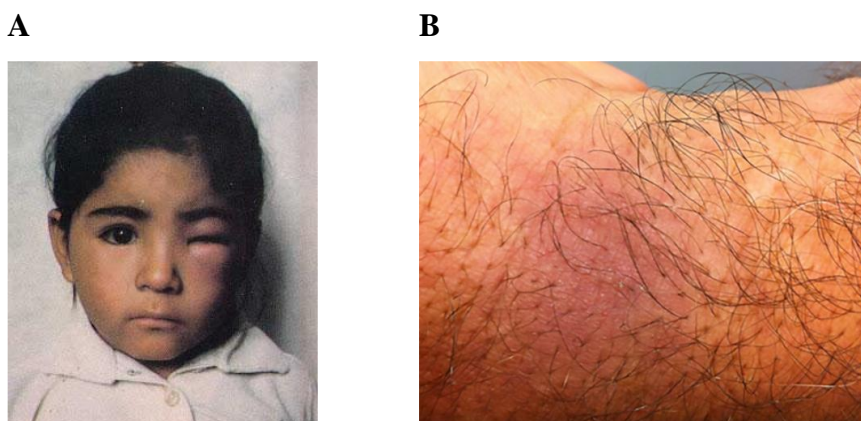
Patogenia

Como mencionado anteriormente, a doença de Chagas apresenta curso clínico bifásico, sendo dividida em fase aguda e fase crônica (que pode ser subdividida em forma indeterminada e forma sintomática) (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015b). A patologia da doença de Chagas é complexa, heterogênea e depende de muitas variáveis, com o parasito e os determinantes da imunidade e da inflamação do hospedeiro tendo papéis críticos (BONNEY et al., 2019).

O período de incubação para as manifestações clínicas pode variar dependendo da forma de transmissão. Pela transmissão vetorial pode variar de 7 a 15 dias, de 8 a 112 dias na transmissão sanguínea e de 2 a 22 dias na transmissão oral. A fase aguda de infecção dura normalmente 8 a 12 semanas, apresentando múltiplas manifestações clínicas, sendo as mais comuns inespecíficas. Em menos de 5% dos casos, pode ocorrer manifestações mais graves, como, miocardite e meningoencefalite (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015b; MCGRATH; FRAME; PALIS, 2015; SUETH-SANTIAGO et al., 2017).

A fase aguda caracteriza-se pela parasitemia patente, onde os tripomastigotas são facilmente encontrados no sangue periférico e há baixos títulos de anticorpos específicos da classe IgG (SILBER; FERREIRA, 2012). Nesta fase podem ocorrer várias manifestações clínicas, com sintomas inespecíficos, incluindo febre, dor de cabeça, mialgia, edema facial, dor abdominal, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia. Um pequeno número de pacientes podem apresentar o chagoma de inoculação (nódulo inflamatório) e/ou o sinal de Romana (edema biperla e unilateral) (Figura 4), que resultam da resposta inflamatória associada ao local de entrada do parasito (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; MCGRATH; FRAME; PALIS, 2015).

Figura 4 - Sinais de porta de entrada do *Trypanosoma cruzi*



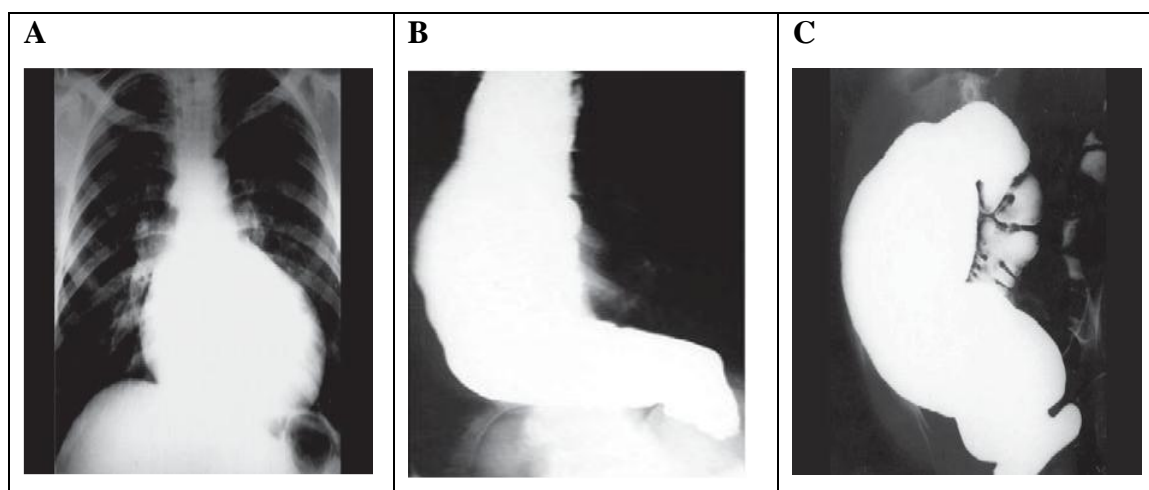
Legenda: (A) Sinal de Romana; (B) Chagoma de inoculação
Fonte: Adaptado de REY, 2013; SANGENIS et al., 2015.

Após a fase aguda, a maioria dos indivíduos entra na fase crônica indeterminada. A forma crônica indeterminada (latente) pode ser caracterizada por (1) positividade de exames sorológicos (detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* por ELISA, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta), (2) ausência de sintomas e/ou sinais da doença, (3)

eletrocardiograma normal e (4) imagens radiográficas normais do coração, esôfago e colón (LANA; TAFURI, 2011; RIBEIRO et al., 2012; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015a).

Dos pacientes infectados cerca de 20-30% progride da fase crônica indeterminada para a fase crônica sintomática. Essa progressão pode ocorrer após um período variável de tempo chegando até 30 anos de infecção (revisado por PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). A fase crônica sintomática apresenta duas formas clínicas importantes, a forma cardíaca e a digestiva (Figura 5). Em regiões endêmicas, a doença de Chagas crônica cardíaca apresenta fenótipos típicos como: bradicardia, bloqueio do ramo direito, bloqueio fascicular anterior esquerdo ou ambas as condições ao eletrocardiograma, cardiomiopatia biventricular, disfunção do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca progressiva, tromboembolismo, arritmias e morte súbita (SUETH-SANTIAGO et al., 2017; CAROD-ARTAL, 2018). Outra característica observada em regiões endêmicas, é o AVC (acidente vascular cerebral) cardioembólico, que pode ocorrer tanto em paciente sintomáticos como assintomáticos (CAROD-ARTAL, 2018).

Figura 5 - Radiografias do coração, esôfago e cólon, representando as formas clínicas da doença de Chagas na fase crônica



Legenda: (A) Cardiopatia chagásica; (B) Megaesôfago; (C) Megacólon.

Fonte: Adaptado de RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010.

Cerca de 15% dos pacientes com doença de Chagas podem desenvolver uma forma crônica digestiva ou cardiodigestiva. Todos os segmentos gastrointestinais podem ser afetados na forma digestiva chagásica crônica, porém o esôfago, o colón e o reto são os mais comumente afetados. A destruição do plexo mioentérico do esôfago causa o megaesôfago. Como consequência ocorrem alterações funcionais que incluem discinesia motora,

hipercontratibilidade e acalasia do esfíncter esofágico. Por outro lado, a desnervação dos segmentos do cólon causa o megacólon que pode provocar desnutrição, constipação crônica, fecaloma e até perfuração (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; CAROD-ARTAL, 2018).

A reativação clínica ou parasitemia patente pode ocorrer em pacientes infectados cronicamente que se tornaram imunologicamente comprometidos, como pacientes coinfectados com HIV, imunossupressão associada ao transplante ou tratamento de câncer. Nesses casos pode ocorrer manifestações clínicas, como meningoencefalite, chagoma cerebral, miocardite aguda ou, mais raramente, cervicite, peritonite espontânea, eritema nodoso e doenças de pele, como paniculite (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SILBER; FERREIRA, 2012; REY, 2013; PÉREZ-MOLINA et al., 2015).

Na fase aguda, as fibras miocárdicas infectadas com *T. cruzi* mostram evidências de danos, caracterizadas por vacuolização, miocitólise e degeneração miofibrilar. O infiltrado inflamatório é inicialmente composto de macrófagos e neutrófilos e depois se torna mais misto com adição de linfócitos, eosinófilos e mastócitos (TAFURI et al., 1983; ANDRADE, 1999; BONNEY et al., 2019). Além disso, outros fatores podem contribuir com o agravamento da resposta inflamatória como, produção local de citocinas, quimiocinas e seus receptores; a regulação positiva das moléculas de adesão; ativação do complemento; agregação e adesão de plaquetas; e produção e opsonização de anticorpos (BONNEY et al., 2019). Dentro de semanas, à medida que a resposta imune adaptativa do hospedeiro se desenvolve, o número de células parasitadas diminui drasticamente e há redução da resposta inflamatória, geralmente com o retorno do tecido do miocárdio para um estado quase normal. As anormalidades residuais da miocardite aguda incluem cicatrizes (fibrose intersticial) e hipertrofia da miofibra, com uma reação inflamatória contínua mínima ou de baixo grau (BONNEY et al., 2019).

A resposta imune Th1 com produção de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF, com aumento da produção óxido nítrico, que atuam como efetores tripanossomicidas, além de anticorpos líticos que são importantes também para a redução do parasito durante a fase aguda (RIBEIRO et al., 2012; RODRIGUES et al, 2017; FELIZARDO et al, 2018). Por outro lado, as alterações patológicas estão associadas a uma resposta tipo 1 elevada no início da infecção, seguida de uma regulação negativa das células Th1 e um aumento das células Th17 durante as fases subsequentes (BONNEY et al., 2019).

Sendo assim, a resposta inflamatória é necessária para o controle do parasito, mas pode induzir inflamação excessiva causando dano tecidual, por exemplo no coração (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; RODRIGUES et al, 2017; FELIZARDO et al, 2018).

A resposta pró-inflamatória embora controle o parasito não o elimina por completo e essa persistência do *T. cruzi* durante o curso da infecção é uma característica importante da fase crônica (RIBEIRO et al., 2012). Na fase crônica, o coração é caracterizado por infiltrados inflamatórios mononucleares multifocal (compostos principalmente de linfócitos e macrófagos), variados graus de fibrose, pequeno número de parasitos teciduais e parasitemia baixa ou indetectável (RIBEIRO et al., 2012; BONNEY et al., 2019). Seria esperado que o parasita tivesse um papel importante no desenvolvimento da patologia, porém a diferença entre a gravidade das lesões observadas e a carga parasitária extremamente baixa na circulação e no tecido durante a fase crônica, pode indicar que existem outros fatores, além da resposta direcionada ao parasito, que possam estar envolvidos no desenvolvimento da patologia chagásica. Alguns fatores citados são correlacionados com reações auto-imunes tais como: (1) presença de anticorpos e células auto-reativas, (2) mimetismo molecular entre os componentes do parasito e do hospedeiro, (3) ocorrências de populações celulares circulantes relacionadas à autoimunidade, como células B CD5⁺ e (4) células de indivíduos com doença de Chagas respondem *in vitro* à antígenos derivados do parasito (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; BONA et al., 2018). Em estudos com pacientes chagásicos foram encontrados níveis altos de anticorpos líticos na fase crônica indeterminada, demonstrando um papel protetor desses anticorpos (CORDEIRO et al., 2001; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005). Além dessa função protetora, os anticorpos podem estar envolvidos em respostas patogênicas, pois foram relatadas evidências de reatividade cruzada entre *T. cruzi* e antígenos humanos, assim como de autoanticorpos que afetam estruturas e funções do músculo cardíaco (BONA et al., 2018).

A expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 em leucócitos de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica se correlaciona com o grau de função cardíaca, de modo que, quanto menor a função cardíaca, menores os níveis de expressão de ambos os receptores. Além disso, indivíduos com doença cardíaca tendem a produzir mais IFN- γ , TNF e IL-6 e menos IL-10 e IL-4 em comparação a pacientes com a forma indeterminada da doença (GOMES et al., 2003; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; BONNEY et al., 2019).

Os desfechos variáveis da infecção pelo *T. cruzi* resultam de uma interação complexa entre hospedeiro-parasito. Isso inclui respostas protetoras do hospedeiro e respostas imunes específicas ao parasito, bem como os efeitos patogênicos da infecção. Assim, para tratar a doença de Chagas com mais eficácia, é preciso determinar como equilibrar essa interação hospedeiro-parasito a favor do hospedeiro (BONNEY et al., 2019).

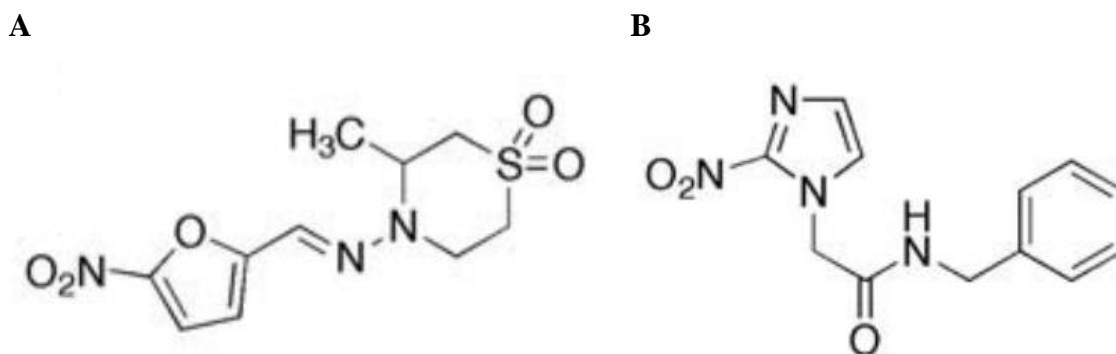
Tratamento

O tratamento da doença de Chagas é limitado a dois fármacos nitrocompostos que são o Nifurtimox (Figura 6A) e o Benznidazol (Figura 6B) há mais de 40 anos. O Nifurtimox (Lampit) é um derivado do nitrofurano produzido pelo laboratório Bayer e o Benznidazol (Rochagan, Rodanil) é um derivado do nitroimidazol, que foi produzido pelo laboratório Roche até 2003, quando transferiu a patente. Desde então a fabricação do Benznidazol é realizada pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes- LAFEPE (BARRETT; CROFT, 2012; F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD, 2013).

Tanto o Nifurtimox (5-nitrofurano) quanto o Benznidazol (2-nitroimidazol) são reconhecidos como pró-fármacos que necessitam ser ativados por enzimas nitroredutases (NTR) tipo I presentes no parasito para a atividade citotóxica (WILKINSON et al., 2011; SALES JUNIOR et al., 2017; KRATZ et al., 2018). As NTRs do tipo I são enzimas contendo mononucleotídeo de flavina, encontrados em protozoários parasitas, como tripanossomos e ausentes na maioria dos eucariotos, inclusive humanos (HALL; WILKINSON, 2011; WILKINSON et al., 2011). Elas funcionam reduzindo o grupo nitro, através de um intermediário nitroso, a um derivado de hidroxilamina por meio de uma série de transferências de elétrons usando NAD(P)H como fonte de equivalentes redutores. Para os nitrofuranos, a forma da hidroxilamina pode ser processada ainda mais para gerar metabólitos citotóxicos e para 2-nitroimidazóis, o metabólito da hidroxilamina pode sofrer rearranjo e hidratação para produzir um dihidro-dihidroxi-imidazol que pode se decompor para liberar glioxal, ambos os produtos são capazes de interagir com uma variedade de biomoléculas, em particular formando adutos com DNA e tióis (HALL; WILKINSON, 2011; WILKINSON et al., 2011; KRATZ et al., 2018).

Embora os mecanismos de ação do Benznidazol e do Nifurtimox não sejam inteiramente conhecidos, a formação de radicais livres durante a sua metabolização é determinante para toxicidade para o parasito (DOCAMPO, 1990; SALES JUNIOR et al., 2017).

Figura 6 - Estrutura química dos fármacos utilizados contra a doença de Chagas



Legenda: (A) Nifurtimox; (B) Benznidazol.
 Fonte: BARRETT; CROFT, 2012.

Ambos os fármacos apresentam diversos efeitos colaterais importantes. O Nifurtimox é tóxico para o sistema nervoso central e periférico causando anorexia, perda de peso, excitabilidade ou perda de sono. Distúrbios gastrointestinais como náuseas, cólicas estomacais, vômitos e diarreia também são comuns (DUTRA et al., 2010; BERN et al., 2011; BARRETT; CROFT, 2012; SALES JUNIOR et al., 2017). A baixa solubilidade do Benznidazol combinada com as altas doses por longo período tratamento pode causar diversos efeitos colaterais como, manifestações cutâneas (hipersensibilidade cutânea e dermatite com erupções), além de anorexia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, congestão e vertigem. As manifestações mais graves incluem supressão da medula óssea (trombocitopenia, neutropenia e agranulocitose) e neuropatia periférica (DUTRA et al., 2010; BERN et al., 2011; BERMUDEZ et al., 2016; SALES JUNIOR et al., 2017).

Apesar dos diversos efeitos tóxicos apresentados pelos dois fármacos, o tratamento é altamente recomendado para todos os casos da infecção na fase aguda, congênita e para pacientes de até 18 anos com a doença na fase crônica. Porém é contra indicado durante a gravidez e em pacientes com deficiência renal grave ou insuficiência hepática (Tabela 1) (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

No Brasil, o Benznidazol é o medicamento de primeira escolha para tratamento da doença de Chagas, em caso de falha terapêutica o Nifurtimox pode ser utilizado, apesar de já tenha sido observada resistência cruzada entre os dois fármacos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Tabela 1 - Características do Benznidazol e Nifurtimox

Fármacos	Benznidazol	Nifurtimox
Mecanismo de ação	Inibição das funções de diferentes macromoléculas (enzimas e lipídeos)	Geração de ciclo redox com formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio
Recomendações	Todos os casos de doença de Chagas na fase aguda, congênita e para pacientes de até 18 anos com a doença na fase crônica	
Contra indicação	Gravidez, pacientes com deficiência renal grave ou insuficiência hepática	
Administração	Adulto: 5mg/Kg/dia, 1 a 3x ao dia, durante 60 dias; Crianças: 5 a 10 mg/Kg/dia, 2x ao dia, durante até 60 dias.	Adulto: 10mg/Kg/dia, 3x ao dia, por 60 dias; Crianças: 15mg/Kg/dia, 3x ao dia, por 60 dias.
Efeitos Adversos	Hipersensibilidade cutânea, dermatite com erupções, anorexia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, congestão, vertigem, depressão de medula óssea e sistema nervoso centra.	Efeitos tóxicos para o sistema nervoso central e periférico, anorexia, perda de sono, problemas gastrointestinais (náuseas, cólicas estomacais, vômitos e diarreia)

Fontes: DUTRA et al., 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; BERMUDEZ et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019.

Em 2011, durante a IV Reunião de Parceiros da DNDi, ocorrida no Rio de Janeiro, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) concedeu o registro da formulação em dose pediátrica do Benznidazol. O novo comprimido de 12,5 mg se desintegra facilmente e é adaptado para bebês e crianças de até dois anos de idade, representando um tratamento mais simples, seguro e com doses mais precisas (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES, 2011). Em 2017, a FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos) aprovou o uso do Benznidazol para o tratamento de crianças entre 2 e 12 anos, tornando-se assim, o primeiro tratamento aprovado para doença de Chagas nos Estados Unidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Recentemente, estudos têm sido conduzidos para avaliar o impacto do tratamento com o Benznidazol na fase crônica da infecção (Tabela 2). Em um estudo com pacientes em fase crônica sem sintomas cardíacos, os resultados sugeriram que a terapia com Benznidazol preveniu o surgimento de alterações no eletrocardiograma (FRAGATA-FILHO et al., 2016). Em outro estudo, com pacientes do Brasil, Argentina, Colômbia, Bolívia e El Salvador, com a cardiopatia estabelecida, o tratamento com Benznidazol foi capaz de reduzir o número de

parasitos sanguíneos, mas não foi capaz de alterar o curso do dano cardíaco (MORILLO et al., 2015).

No estudo "CHAGASAZOL" foi comparado o uso do Benznidazol com alta e baixa dose de Posaconazol. Esse estudo foi conduzido primeiramente em pacientes da Bolívia, Brasil e Paraguai, na fase crônica com ou sem comprometimento cardíaco e/ou gastrointestinal (MOLINA et al., 2014). O Posaconazol é um antifúngico sistêmico de azol, que age inibindo a CYP51 (lanosterol 14- α - desmetilase) que está envolvido na síntese de ergosterol (CLARK; GRIM; LYNCH, 2015) e apesar do Posaconazol ter apresentado atividade considerável em modelos murinos (fase aguda e crônica), os resultados desse estudo demonstraram que pacientes tratados com baixas ou e altas doses de pozaconazol tiveram uma maior porcentagem de falha terapêutica do que os paciente tratados com Benznidazol (MOLINA et al., 2014).

Na tentativa de melhorar a eficácia do tratamento, sobretudo na fase indeterminada da doença, têm sido realizados estudos com terapia combinada usando Benznidazol e outros fármacos. No estudo "STOP-CHAGAS" foi realizada terapia combinada entre Posaconazol e Benznidazol em pacientes na fase crônica assintomática, os resultados indicaram que essa combinação não teve benefícios em comparação com a monoterapia com Benznidazol, porém houve alta taxa de descontinuidade do tratamento por pacientes tratados com Benznidazol (MORILLO et al., 2017).

Em um outro estudo "BENDITA" (*B*Enznidazol *N*ew *D*oses *I*mproved *T*reatment and *A*ssociations) foi avaliado o efeito do Benznidazol associado ou não ao fosravuconazol em paciente crônicos com doença de Chagas (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019). O Fosravuconazol é um antifúngico triazólico, pró-fármaco do Ravuconazol usado no tratamento de onicomicoses (YAMAGUCHI, 2016). Os resultados desse estudos indicaram 83% de eficácia na monoterapia com o Benznidazol por duas semanas com ausência de parasitemia até a avaliação final (12 meses) (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

Um estudo iniciado em outubro de 2017, na Espanha pretende avaliar diferentes regimes de tratamento com o Fexinidazol em paciente na fase crônica interminada (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2020). O Fexinidazol é um derivado do 5-nitroimidazol com capacidade de inibir a síntese de DNA, e atualmente é usado no tratamento da tripanossomíase africana (Fase III) (DEEKS, 2019). Os resultados desse estudos estarão disponíveis em breve (2020) (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2020).

Embora esforços estejam sendo feitos na busca de por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas, não há nenhum progresso em relação ao tratamento já existente, sobretudo para a fase indeterminada da infecção.

O potencial das Pterocarpanonoquinonas

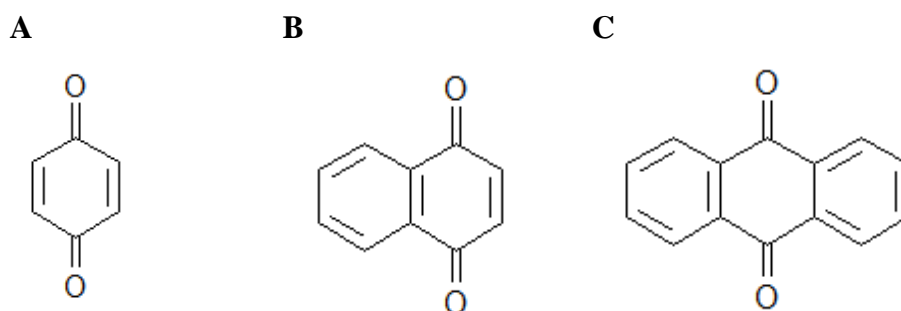
As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Com base na estrutura molecular, elas são divididas em três diferentes grupos de acordo com o anel quinonoídica (Figura 7): benzoquinonas (um anel benzênico), naftoquinonas (um anel naftalênico) e antraquinonas (um anel antracênico linear ou angular) (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

As naftoquinonas são metabólitos secundários amplamente distribuídas no reino vegetal. Assim como as outras quinonas, as naftoquinonas apresentam em sua estrutura molecular características que proporcionam propriedades redox, que podem interferir em processos oxidativos das células. O lapachol e a β -lapachona são exemplos de naftoquinonas naturalmente encontradas em plantas da família Bignoniaceae (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; MENNA-BARRETO et al., 2009b, 2009a). A β -lapachona (ortopirano-naftoquinona), apresenta uma diversificada ação farmacológica envolvendo principalmente o ciclo redox, além de atividade inibidora das topoisomerasas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Tabela 2 - Fármacos testados em fase clínica sozinhos ou em associação com Benznidazol

Estudo	Objetivo	Resultado	Fonte
CHAGASAZOL	Avaliar a eficácia e segurança do Posaconazol em comparação com o Benznidazol em 78 pacientes com infecção crônica com ou sem comprometimento cardíaco e/ou gastrointestinal, da Bolívia, Brasil e Paraguai.	Pacientes tratados com baixas ou altas doses de pozaconazol tiveram uma maior porcentagem de falha terapêutica do que os paciente tratados com Benznidazol.	(MOLINA et al., 2014)
BENEFIT	Avaliar o tratamento com Benznidazol (40 a 80 dias) em 2854 pacientes com cardiomiopatia chagásica, de 49 centros no Brasil, Argentina, Bolívia, Colombia e El Salvador.	Redução da detecção de parasitos, porém sem redução dos danos cardíacos durante os 5 anos de acompanhamento.	(MORILLO et al., 2015)
Benznidazol	Avaliar o tratamento com Benznidazol em 310 pacientes com infecção crônica e eletrocardiograma normal.	O tratamento preveniu o surgimento de anomalias no eletrocardiograma dos pacientes.	(FRAGATA-FILHO et al., 2016)
STOP-CHAGAS	Avaliar a terapia combinada entre Posaconazol e Benznidazol em 120 pacientes na fase crônica assintomática, em 19 centros de 5 países da América Latina e Espanha.	A combinação não teve benefícios em comparação com a monoterapia com Benznidazol, porém houve alta taxa de descontinuidades do tratamento em pacientes tratados com Benznidazol.	(MORILLO et al., 2017)
BENDITA	Avaliar a eficácia de diferentes doses de Benznidazol em monoterapia e em combinação com o Fosravuconazol em 210 paciente na fase crônica indeterminada da doença de Chagas. Esse estudo foi realizado com pacientes da Bolívia.	83% de eficácia na monoterapia com o Benznidazol (duas semanas de tratamento) com ausência de parasitemia até a avaliação final (12 meses).	(DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019)
FEXINIDAZOL	Estudo iniciado em 2017, onde 45 paciente na Espanha foram recrutados para Fase II do teste de diferentes regimes de curta duração do Fexinidazol para adultos com doença de Chagas crônica indeterminada.	Dados disponíveis em 2020.	(DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2020)

Figura 7 - Classificação das quinonas



Legenda: (A) Benzoquinona;(B) Naftoquinona;(C) Antraquinona.
 Fonte: Adaptado de SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003.

Moléculas derivadas da β -lapachona, como naftoimidazol e naftofuranoquinona, demonstraram atividade contra as três formas de *T. cruzi*, com produção citoplasmática de ROS, disfunção mitocondrial (SILVA et al., 2006; MENNA-BARRETO et al., 2007, 2009a, 2009b; BOMBAÇA et al., 2019), fragmentação de DNA e alterações ultraestruturais, sugerindo o envolvimento da autofagia na morte do parasito (MENNA-BARRETO et al., 2007). Outro derivado da β -lapachona, R72, apresentou atividade sobre epimastigotas de *T. cruzi* envolvendo apoptose e necrose induzida por autofagia (ANJOS et al., 2016).

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) e algumas moléculas derivadas apresentam diversas atividades biológicas, tais como efeitos anticoagulantes, anti-inflamatórios, antitérmicos, ação citostática (contra diversos tumores), antiviral, moluscicida (contra caramujos *Biomphalaria glabrata*), além de atividades microbicidas, tais como, bacteriostática, fungistática, cercaricida, leishmanicida, tripanossomicida e antimalárico (OLIVEIRA et al., 1990; ARAUJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; HUSSAIN et al., 2007).

Os pterocarpanos são isoflavonoides, constituídos por um sistema de anel tetracíclico com benzofurano-benzopirano (SELVAM et al., 2017) e várias ações farmacológicas são relatadas para esta classe. Análogos de pterocarpanos são capazes de inibir a proliferação de linhagens leucêmicas com bloqueio do ciclo celular (MILITÃO et al., 2007, 2014) e indução de apoptose (BUARQUE et al., 2014).

Além da atividade antileucêmica, já foi relatada a atividade anti-inflamatória, com inibição da desgranulação de neutrófilos e da produção de óxido nítrico por macrófagos (WENG et al., 2003) e a ação antioxidante (LEE et al., 2006). Além disso, também há

atividade *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum* (YENESEW et al., 2012; SELVAM et al., 2017) e ação sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (VIEIRA et al., 2008).

Com base no potencial das naftoquinonas e dos pterocarpanos, foram planejadas e sintetizadas moléculas híbridas denominadas pterocarpanoquinonas. Essas moléculas inibiram a proliferação de linhagens leucêmicas (NETTO et al., 2010; BUARQUE et al., 2011) e suas atividades antiparasitárias foram demonstradas sobre formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* com aumento de ROS e alteração do potencial de membrana (BUARQUE et al., 2011; FAIÕES et al., 2018). Entre essas pterocarpanoquinonas com atividade antitumoral e antiparasitária está a LQB-118.

A pterocarpanoquinona LQB-118

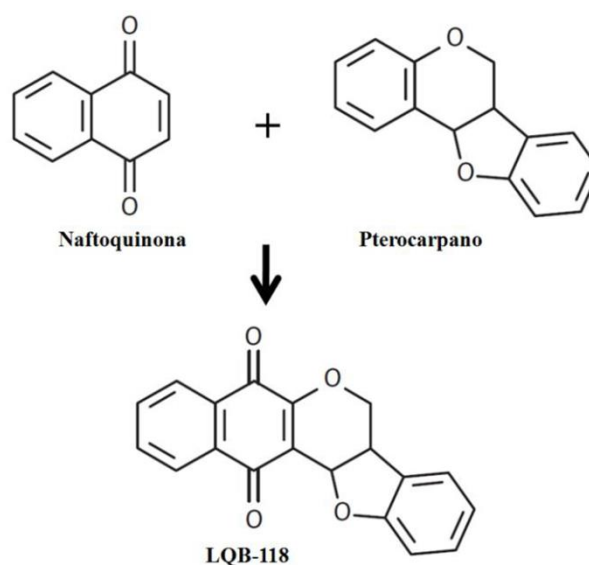
Vários estudos tem demonstrado ação antitumoral e antiparasitária da LQB-118 (Figura 8). A molécula induz apoptose em células de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) (MAIA et al., 2011) e em linhagens celulares tumorais (BUARQUE et al., 2011). Foi observado também aumento intracelular de cálcio em ambas as linhagens e despolarização da membrana mitocondrial nas células de linhagem de LMC (DE SÁ BACELAR et al., 2013). A LQB-118 também induz apoptose em células de linhagem de leucemia mielóide aguda por inibição de inibidores de apoptose, XIAP e survivina (REIS et al., 2013). Além das linhagens de células de leucemia mielóide aguda e crônica, a LQB-118 também inibiu a proliferação de células de câncer de próstata *in vitro*, induzindo apoptose (MARTINO et al., 2014).

Os efeitos antiparasitários da LQB-118 foram demonstrados em várias espécies distintas. Sobre o *Toxoplasma gondii*, a LQB-118 induziu *in vitro* alteração morfológicas e a conversão dos taquizoítos em bradizoítos (PORTES et al., 2012). Em *Leishmania amazonensis*, a LQB-118 foi capaz de promover morte por apoptose e diminuir a produção de ATP de promastigotas e em amastigotas induziu a fragmentação do DNA (RIBEIRO et al., 2013). A LQB-118 também demonstrou ação terapêutica quando administrada por via oral em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, diminuindo a lesão na pata e a carga parasitária (CUNHA-JUNIOR et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados pelo nosso grupo em estudos com *L. braziliensis*, onde a LQB-118 induziu apoptose em promastigotas, aumento da produção de ROS e redução da produção de ATP (COSTA et al.,

2014). Quando administrada por via oral ou intralesional, a LQB-118 diminuiu significativamente o tamanho da lesão e a carga parasitária de hamsters infectados com *L. braziliensis* (COSTA et al., 2014). Além dos modelos de leishmaniose cutânea, a LQB-118 apresentou atividade em modelo de leishmaniose visceral reduzindo a carga parasitária no fígado e baço, de animais infectados com *L. infantum* (CUNHA-JÚNIOR et al., 2016).

Devido ao espectro de ação, já descrito na literatura, da LQB-118 abrangendo atividade antitumoral e antiparasitária, sobretudo em diferentes espécies de *Leishmania*, nosso grupo iniciou um estudo da ação da molécula em *Trypanosoma cruzi*. Visto que os medicamentos disponíveis para tratar a doença de Chagas são tóxicos e com eficácia limitada à fase aguda da doença, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas são extremamente importantes, sobretudo que apresente eficácia na fase crônica da doença.

Figura 8 - Estrutura química da LQB-118.



Fonte: Adaptado de CUNHA-JUNIOR et al., 2011

1 OBJETIVO

1.1 Geral

Estudar o potencial terapêutico da pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção experimental com *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), com ênfase na fase crônica da infecção

1.2 Específicos

Determinar a atividade *in vitro* sobre formas epimastigotas, tripomastigota e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y e estabelecer a IC₅₀ (concentração inibitória de 50%);

Estabelecer o modelo experimental para a fase crônica da infecção usando a cepa Y em camundongos *Swiss Webster*;

Avaliar a ação terapêutica da LQB-118 administrada pela via oral em camundongos na fase aguda e crônica da infecção;

Investigar o efeito do tratamento sobre os níveis de parasitemia, aspectos clínicos e sobrevivência dos animais;

Analisar aspectos histopatológicos do tecido cardíaco nos animais tratados na fase aguda ou na fase crônica da infecção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Considerações éticas

Todos os procedimentos com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Cuidados e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ Protocolo nº CEUA/050/2017.

2.2 LQB-118

O planejamento e a síntese da pterocarpanoquinona LQB-118 foi realizada pelo grupo do prof^o Paulo Roberto Ribeiro Costa, do Laboratório de Química Biorgânica (LQB) do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A LQB-118 liofilizada foi solubilizada em DMSO 100% (Sigma- Aldrich) a partir da qual foram feitas diluições em meios de cultura para uso nos experimentos. A concentração final máxima de DMSO nas culturas de células não ultrapassou 0,1%.

2.3 Parasito

Neste trabalho foi utilizado o *Trypanosoma cruzi* da cepa Y. A cepa foi cedida pelo grupo de pesquisa da Dra. Marcia Cristina Paes (Laboratório de Interação Tripanossomatídeos e Vetores – IBRAG/UERJ/RJ) e posteriormente mantida em cultura e passagens periódicas em camundongos como descrito a seguir nos itens 2.4 e 2.5.

2.4 Cultivo de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y)

Os epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram mantidos por repiques semanais em garrafas contendo 5 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion) (BactoBecton, Dickinson and Company) com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab) e estéril, na presença de 30 μ M de Hemina Bovina (Sigma - Aldrich) e cultivados em estufa a 27°C.

2.5 Manutenção em camundongos e obtenção de tripomastigotas sanguíneos

Os animais infectados foram mantidos no biotério da Disciplina de Parasitologia (FCM/UERJ/RJ). As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas sistematicamente de camundongos *Swiss Webster* após sete dias de infecção. Os parasitos foram adquiridos do sangue por punção cardíaca, após a eutanásia, em câmara de gás carbônico (CO₂). A punção cardíaca foi realizada utilizando a seringa contendo 0,5mL de solução de citrato de sódio 3,8% (Sigma - Aldrich) e em seguida, o sangue obtido foi injetado em camundongos *Swiss Webster* saudáveis por via intraperitoneal (0,2mL/animal). O volume de 0,2 mL de sangue continha aproximadamente 10⁵ tripomastigotas sanguíneos.

Para a obtenção de grande quantidade de tripomastigotas sanguíneo (massa do parasito), camundongos *Swiss Webster* foram infectados com 10⁵ tripomastigotas e após 48h da infecção foram submetidos à imunossupressão com 8mg/Kg/animal de ciclofosfamida monoidratada (Baxter). No 7º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados e o sangue obtido por punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em tubos criogênicos com rosca externa, homogeneizado e centrifugado a 255g por 22 minutos a 24°C. Após a centrifugação, os tubos foram colocados em estufa à 37°C por 20 minutos. Passado esse tempo, o plasma foi coletado em tubos de fundo cônico e centrifugado à 2459g por 15 minutos à 24°C e o sobrenadante foi descartado (Adaptado de MEIRELLES; ARAÚJO JORGE; SOUZA, 1982). O sedimento contendo os parasitos foi ressuspenso em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Os tripomastigotas foram contados na câmara de Neubauer e ajustados para a concentração necessária para o uso nos experimentos.

2.6 Avaliação da atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas cultivadas como descrito no item 2.4 foram obtidas após sete dias de cultura em meio BHI, contadas e ajustadas para 5×10^5 células/mL. Em uma placa de 24 poços foram adicionados 500µL de epimastigotas em meio BHI e 20% de soro fetal bovino (concentração final de $2,5 \times 10^5$ parasitos/ poço) aos quais foram adicionado 500µL de meio BHI contendo concentrações variadas da LQB-118 (concentração final de 0-5µM). Para os grupos controle foram utilizados parasitos cultivados com meio BHI na ausência ou presença de DMSO (correspondendo ao percentual presente na maior concentração de LQB-118 no ensaio). A incubação foi feita em estufa de 27°C por 96 horas e os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer.

2.7 Avaliação da atividade da LQB-118 sobre tripomastigotas sanguíneas *in vitro*

As formas tripomastigotas sanguíneas (obtidos como descrito no item 2.5) foram plaqueadas na concentração de 1×10^7 /mL em placa de 96 poços (0,1 mL/poço) com LQB-118 (0,1 mL/poço; concentração final de 0-40µM). Os controles foram parasitos cultivados com meio RPMI 1640 na ausência ou presença de DMSO (correspondendo ao percentual presente na maior concentração de LQB-118 utilizada no ensaio). As culturas foram mantidas a 37°C/5%CO₂ por 24 horas e os tripomastigotas móveis foram contados em câmara de Neubauer.

2.8 Citotoxicidade da LQB-118 sobre macrófagos peritoneais murino

Monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongo *Swiss Webster* foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (200µL/poço), na concentração de 2×10^6 células/mL e incubadas por 24h a 37°C/5%CO₂, para a aderência. Decorrido esse tempo, o

sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118 (0-100 μ M) durante 48 horas a 37°C/5%CO₂. Após 43 horas, foram adicionados 22 μ L de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazólio) e a placa foi incubada por 5 horas à 37°C/5%CO₂ em câmara escura, totalizando 48 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi desprezado e 180 μ L de DMSO (100%) foi adicionado para dissolver os cristais de formazan formados. Em seguida, a absorbância foi avaliada a 570nm em espectrofotômetro de placa. Os controles foram células tratadas ou não com DMSO 0,08% (Sigma-Aldrich) ou Triton 1%.

2.9 Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*

Macrófagos peritoneais de camundongos foram aderidos *overnight* em placas de 24 poços com lamínula de vidro no fundo (1x10⁶ células/poço) a 37°C/5%CO₂. As células não aderentes foram removidas e as monocamadas de macrófagos foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos proporção 1:1 (1 tripomastigota para 1 macrófago) por 10h a 37°C/5%CO₂. Após esse período os parasitos não internalizados foram removidos por lavagens com PBS (37°C) e a monocamada foi tratada com diferentes concentrações de LQB-118 (0-10 μ M) por 48h. Os controles foram macrófagos infectados cultivados apenas em meio de cultura (RPMI 1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino com adição ou não de DMSO 0,0013% (Sigma-Aldrich). Ao final da incubação de 48h, os sobrenadantes foram colhidos e congelados a -20°C. As monocamadas de macrófagos foram coradas com Panótico (Laborclin). O número de amastigotas intracelulares foi contado em microscópio óptico (mínimo de 200 macrófagos/lamínula). Os resultados foram expressos como Índice de infecção, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de infecção: } \frac{\% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{Número de amastigota}}{\text{Número total de macrófagos}}$$

2.10 Infecção de animais e grupos experimentais

2.10.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos da linhagem *Swiss Webster* de ambos os gêneros, com idade entre 5 a 6 semanas, pesando de 20 a 30 gramas. Os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em gaiolas plásticas, em ambiente com renovação constante do ar, sob temperatura controlada ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentação com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

2.10.2 Grupos experimentais e tratamento com LQB-118 nas fases aguda e crônica da infecção

Para a fase aguda, após a parasitemia ser confirmada no quarto dia após a infecção, os animais foram divididos em 4 grupos: (1) Animais infectados e não tratados (n=10); (2) Animais infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) via oral (n=8); (3) Animais não infectados e não tratados (n=3) e (4) Animais não infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) por via oral (n=3). O tratamento com a LQB-118 foi realizado durante 12 dias consecutivos a partir do quarto dia de infecção (Figura 9). A LQB-118 foi solubilizada no veículo ORA-Plus (Perrigo®) e cada animal recebeu 100µL dessa solução uma vez ao dia, correspondendo a 40mg/Kg/dia. Ao final do tratamento (16 dpi), os animais foram eutanasiados e o coração foi removido para processamento e análise histopatológica.

Para tratamento na fase crônica, os animais foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y (obtidos como descrito no item 2.5). Aspectos clínicos-comportamentais e a parasitemia foram analisados durante o curso da infecção (posteriormente descrito no item 2.10.4 e no desenho experimental, Figura 9). Após o início da fase crônica (parasitemia negativa), os animais foram divididos em 4 grupos: (1) Animais infectados e não tratados (n=10); (2) Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia por via oral (n=9); (3) Animais não infectados e não tratados (n=5) e (4)

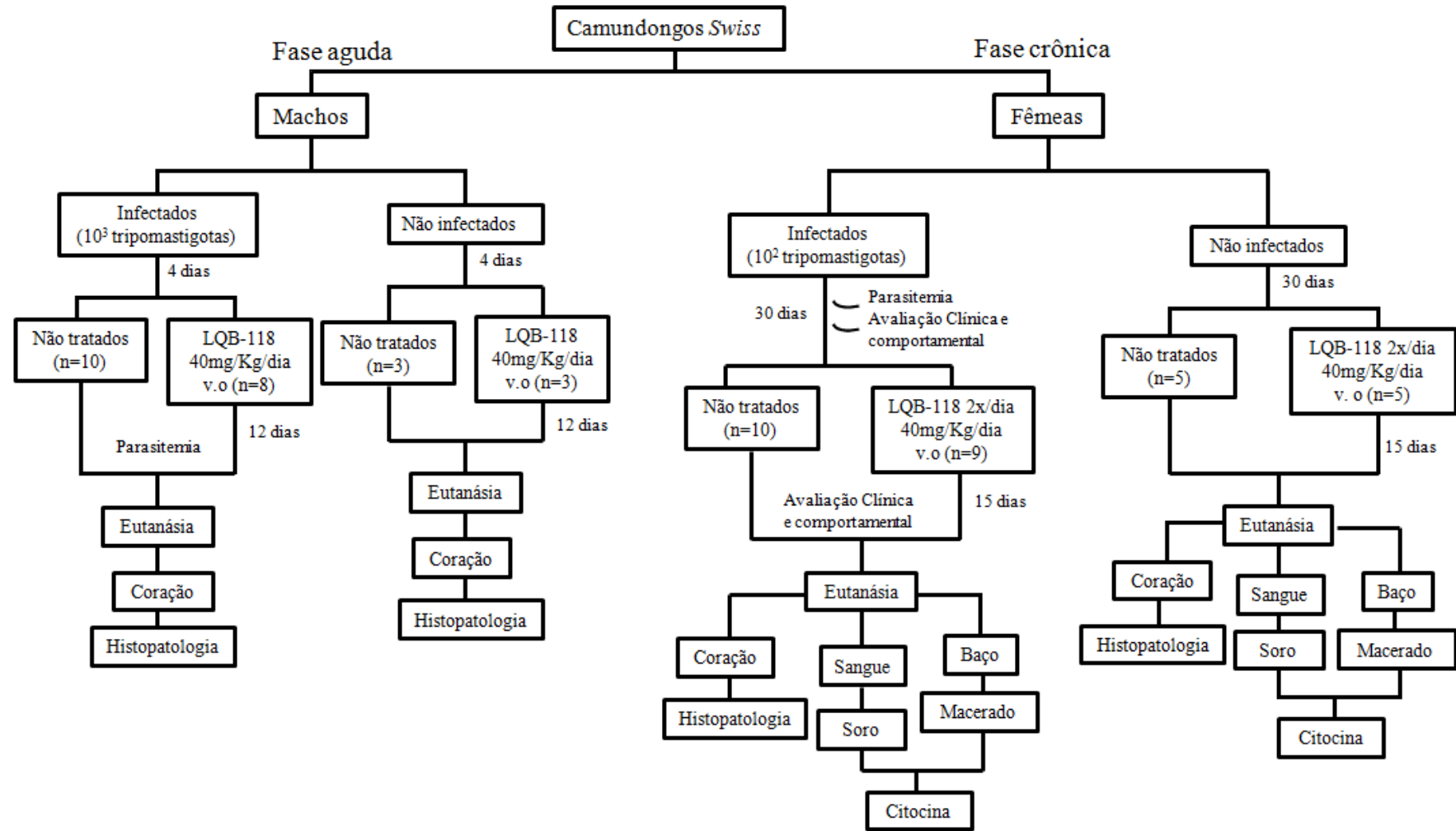
Animais não infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia por via oral (n=5). Para realizar o tratamento oral, a LQB-118 foi solubilizada ao veículo ORA-Plus (Perrigo®). Cada animal tratado recebeu 100µL dessa solução (20mg/Kg) duas vezes ao dia, totalizando 40mg/Kg/dia, durante 15 dias consecutivos. Um dia após o término do tratamento, os animais foram pesados e eutanasiados. O sangue foi colhido por punção cardíaca. O coração e o fígado foram retirados para processamento e análise histopatológica.

2.10.3 Determinação da susceptibilidade entre macho e fêmea de camundongos *Swiss Webster* e estabelecimento da fase crônica da infecção

Para estabelecimento da infecção crônica pelo *T. cruzi* (Figura 9), camundongos *Swiss Webster* (19 fêmeas e 18 machos), foram infectados por via intraperitoneal, com 500, 100 e 40 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (obtidos como descrito no item 2.5). Foi realizada a pesagem, aferição a temperatura corporal e a cada dois dias, a avaliação comportamental (vocalização, irritabilidade, anorexia, postura anormal, torção e espasmos) e a aparência (postura encurvada, piloerção e olhos afundados) (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; MAZZETI et al., 2018a) foi analisada e fotografada. A sobrevivência foi avaliada diariamente até o fim do experimento. A parasitemia foi avaliada diariamente até a detecção dos parasitos ser negativa. Essa avaliação foi realizada através do método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962) (posteriormente descrito no item 2.10.4).

A ausência de parasitemia nos animais foi considerada o início da fase crônica (SILVA et al., 1999). Após constatada o início da fase crônica (30 dpi), os animais foram eutanasiados e o coração, fígado e baço foram removidos, lavados em solução salina 0,9%, secos em papel filtro e pesados. O coração foi processado para avaliação histopatológica.

Figura 9 - Desenho experimental da avaliação terapêutica da LQB-118 na infecção pelo *T. cruzi*



2.10.4 Avaliação da parasitemia e mortalidade

Para a avaliação da parasitemia foi realizado o método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962), utilizando o seguinte protocolo: (1º) assepsia da cauda de cada animal com gaze embebida em álcool etílico 70%; (2º) corte de aproximadamente 1mm da extremidade distal da cauda utilizando um bisturi cirúrgico (nº 21); (3º) coleta da segunda gota de sangue (5µl) e disposta em uma lâmina para microscópio, coberta com lamínula (24mm x 24mm); (4º) Contenção do sangramento da cauda do animal com permanganato de potássio; (5º) Contagem dos parasitos ao microscópio de luz com objetiva de 40x.

Foram avaliados 100 campos aleatórios. Para calcular a concentração de parasitos/mL foi utilizado o seguinte cálculo (CASTRO et al., 2000):

1º) $n' = \frac{\text{nº de parasitos}}{\text{nº de campos}}$	n' : nº de parasitos em 1 campo
2º) $n'' = \frac{n' \times Al}{Ac}$	n'' : nº de parasitos em toda a lamínula
3º) $n''' = n'' \times 200$	n''' : concentração do parasito (nº de parasitos em 1mL)
	Ac : área do campo observado (πr^2 mm ²)
	r: d/2 (d: diâmetro do campo observado)
	Al : área da lamínula

Primeiramente se calculou o número em 1 campo (1º); com esse resultado, pode-se calcular o número de parasitos existentes em toda a lamínula (2º), depois multiplicou o valor obtido por 200 (3º). Para avaliação da mortalidade, os animais foram observados diariamente (pela manhã e no final do dia) e o número de óbitos registrado.

2.10.5 Avaliação clínica e comportamental

Os animais foram clinicamente avaliados a cada dois dias, registrando-se peso e temperatura. A pesagem foi feita em balança de precisão (Marte AL 500) e a temperatura aferida utilizando termômetro infravermelho (Infrared thermometer). Mudanças

comportamentais foram avaliadas pela observação e registro de alterações no padrão de movimentação e surgimento de tremores.

2.10.6 Dosagem de citocinas

A avaliação do perfil de citocinas do soro de camundongos *Swiss Webster* no início da fase crônica da infecção por *Trypanosoma cruzi* foi feita através de citometria de fluxo pelo método *Cytometric Bed Array* (CBA), utilizando o *Mouse TH1/TH2/TH17 Cytokine Kit* para detecção de IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 (BD Bios-cienses Pharmigen, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Esse método se baseia no uso de microesferas de poliestireno com diferentes intensidades de fluorescência, conjugadas a anticorpos específicos que fornece um sinal luminoso em proporção a quantidade de microesferas ligadas. Os complexos formados (citocinas + microesferas fluorescentes conjugadas + anticorpo marcado) são detectados por citometria de fluxo e os resultados expressos em pg/mL.

Os soros dos camundongos (50 μ L) foram incubados em tubo de vidro com as microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para cada citocina e com o anticorpo de detecção conjugado ao marcador ficoeritrina (PE) sob proteção da luz, em temperatura ambiente por 2 horas. Uma curva padrão foi feita incubando as microesferas em diferentes concentrações (0-5000 pg/mL) de acordo com o procedimento anterior. Após o tempo de incubação, em cada tubo foi adicionado 500 μ L de solução de lavagem e feita uma centrifugação a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado com 300 μ L da solução de lavagem. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (BD FACS Canto II). A análise dos resultados foi feita através do programa *FCAP Array Software*, para a plotagem dos gráficos.

2.10.7 Processamento das amostras de tecido para análise histopatológica

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados e o coração foi removido. O coração foi lavado em solução salina 0,9%, o excesso de solução foi retirado com um papel de

filtro absorvente e então os tecidos foram fixados em formol 10% tamponado (Proquímios). A solução de formol foi trocada após 24 horas. Para a avaliação na fase aguda, o coração fixado foi cortado no plano transversal, para observação do miocárdio sem necessidade de discriminar uma área específica, já para a avaliação na fase crônica, o órgão foi cortado no plano sagital com o intuito de analisar as quatro cavidades do coração, pois a doença de Chagas crônica cardíaca pode apresentar disfunção do ventrículo esquerdo (SUETH-SANTIAGO et al., 2017; CAROD-ARTAL, 2018).

As amostras de coração foram colocadas em cassetes individuais e lavadas para retirada do excesso de fixador, em seguida foram desidratadas, diafanizadas e iniciada a impregnação com parafina líquida. Na última etapa do procedimento, a amostra foi colocada em um banho de parafina líquida (60°C). Para evitar quebras e rachaduras durante a solidificação dos blocos, os moldes ficaram em temperatura ambiente, para que a temperatura do mesmo diminuísse de forma gradual. Atingida a temperatura ambiente, os moldes foram colocados a -18°C por 20 a 30 minutos e posteriormente, retirados das formas de alumínio e guardados em caixas plásticas, protegidos do calor e umidade excessivos. Os blocos foram cortados em 3µm de espessura, utilizando micrótomo (Leica RM2125 RTS). Os cortes foram esticados em banho-maria e montados em lâminas de vidro.

Para avaliação do infiltrado inflamatório e dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco foi realizada a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) e para a quantificação do colágeno foi realizado a coloração Picrosirius (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1971). As lâminas contendo os cortes foram colocadas na estufa a 60°C, em seguida iniciou-se o processo de desparafinização em xilol e hidratação das amostras com soluções decrescentes de álcool etílico, lavagem e coloração das lâminas. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico e com xilol. As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec) e coberta com lamínula.

2.10.8 Análise histopatológica

Os cortes do tecido cardíaco corados com HE e Picrosirius foram analisados e fotografados utilizando microscópio (Nikon ECLIPSE 80i) acoplado a uma câmera de vídeo digital (Nikon DS-Ri7) usando o programa NIS-Elements AR 3.2 ou ImagePro.

A quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco corados com HE foi realizada por contagem do número total de ninhos em cada corte (1 corte/coração) usando aumento de 400x.

O infiltrado inflamatório foi analisado nos cortes corados com HE utilizando dois métodos: Estereologia com um sistema-teste constituído por 36 pontos testes (PT) (D36) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003) e o sistema de escore semiquantitativo (YANG et al., 2013).

A estereologia é um método que estima densidades por volume e por área, e nesse trabalho foi utilizado a avaliação da densidade de volume (V_v) através da razão entre os pontos parciais (P_p) contados em uma seção em relação ao total de pontos-teste (P_t) (fórmula: $V_v = P_p/P_t$) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

No método por escore, além do infiltrado inflamatório, foram identificados os tipos celulares, a degradação de miócitos e os ninhos de amastigotas. O valor do escore foi determinado assim: ausente (escore=0), pouco observado (escore=1), moderadamente observado (escore= 2) e muito observado (escore= 4).

2.11 Análise estatística

Nos experimentos *in vitro* os dados obtidos foram analisados pelo teste de análise de variância de entrada única (One Way ANOVA) com pós-teste Newman-Keuls. A determinação da IC_{50} foi feita por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism 6. Nos experimentos *in vivo* foi utilizado o teste não paramétrico, Test t (Mann-Whitney test) para avaliações quantitativas e Teste de Fisher's para avaliações semiquantitativas. Valores de p iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade *in vitro* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o *Trypanosoma cruzi*

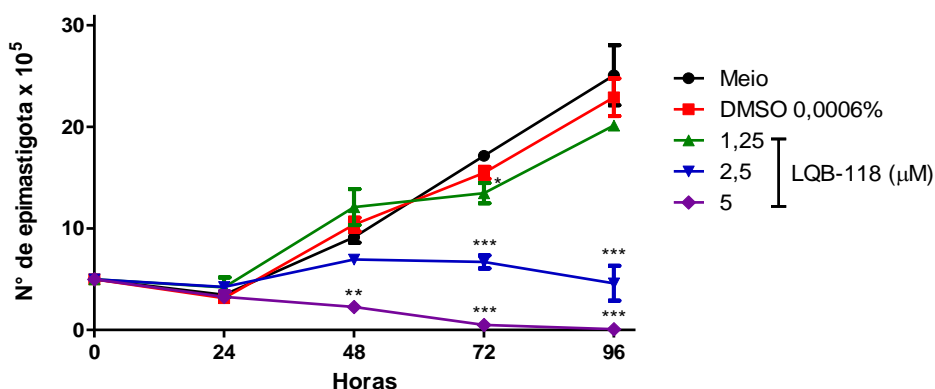
Para avaliar a atividade da LQB-118 sobre a cepa Y do *T. cruzi*, testamos a molécula *in vitro* nas três principais formas evolutivas do parasito.

3.1.1 Atividade da LQB-118 sobre o crescimento de epimastigotas

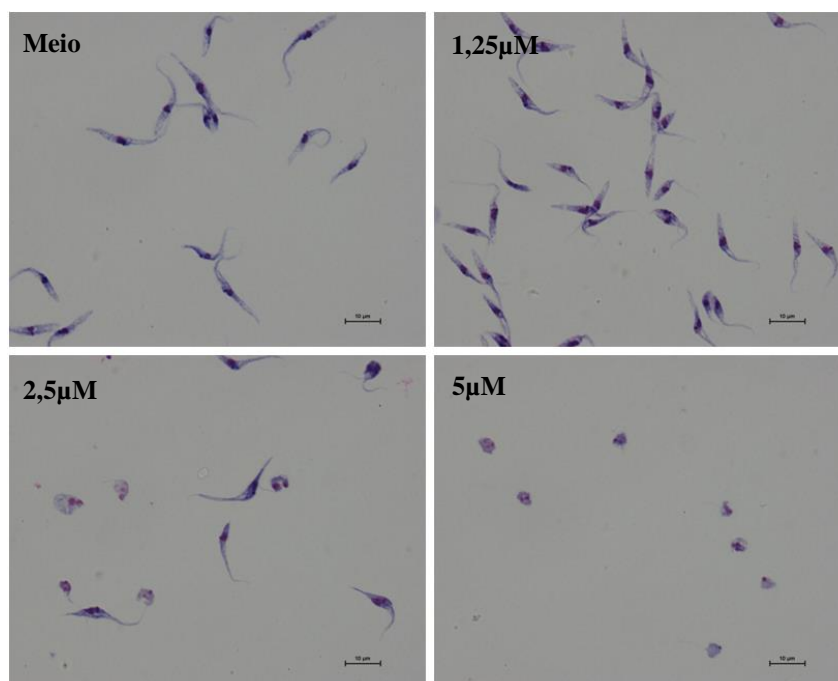
Epimastigotas foram incubadas com a LQB-118 (0-5 μ M) a 27°C durante 96 horas. Os epimastigotas foram contadas diariamente e os resultados mostraram que a LQB-118 inibiu significativamente o crescimento do parasito a partir de 48 horas de cultura, reduzindo em 75,2% o número de células com 5 μ M da LQB-118. A inibição da multiplicação dos parasitos foi dose-dependente (Figura 10A) e a IC₅₀ foi estimada em 2,04 μ M \pm 0,07 em 72h e 1,82 μ M \pm 0,17 em 96 horas. Observamos também que o tratamento com a LQB-118 promoveu mudanças morfológicas nas formas epimastigotas. Em 96h de cultivo os parasitos apresentaram encolhimento e arredondamento do corpo celular, principalmente nas concentrações de 2,5 μ M e 5 μ M testadas (Figura 10B).

Figura 10 - Efeito da LQB-118 no crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A



B



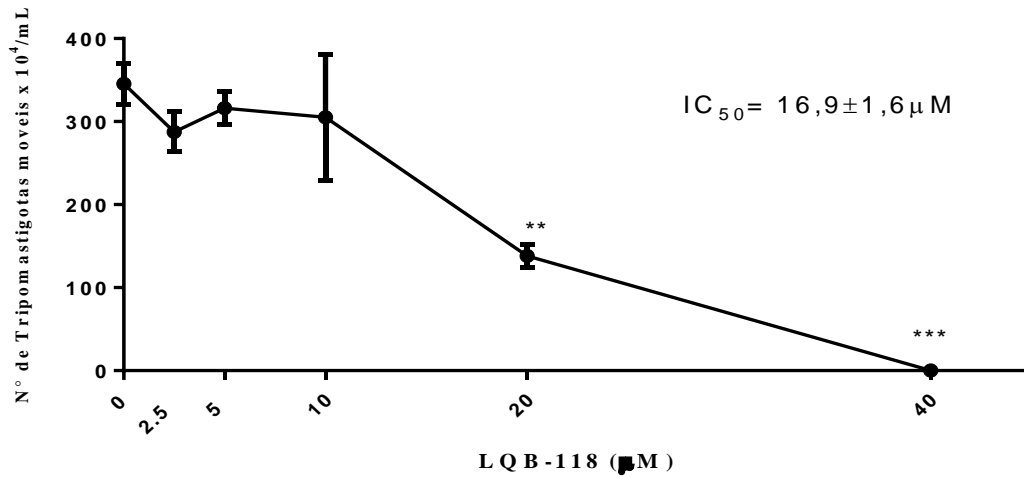
Legenda: Epimastigotas (cepa Y) foram incubadas em triplicata com a LQB-118 (0-5 μ M) por 96h/27°C. A) O crescimento do parasito foi acompanhado com contagens diárias em câmara de Neubauer. Controles foram parasitos cultivados em meio BHI suplementado com Hemina (30 μ M) contendo ou não DMSO 0,0006%. B) Após 96h de tratamento os parasitos foram lavados, corados com Panótico, analisados e fotografados em microscopia de luz. **p<0,001; ***p<0,0001. One Way ANOVA (pós-teste Newman-Keuls). Aumento: 400x. Gráfico representativo. (n=3)

Fonte: A autora, 2020.

3.1.2 Atividade da LQB-118 sobre a motilidade de tripomastigotas

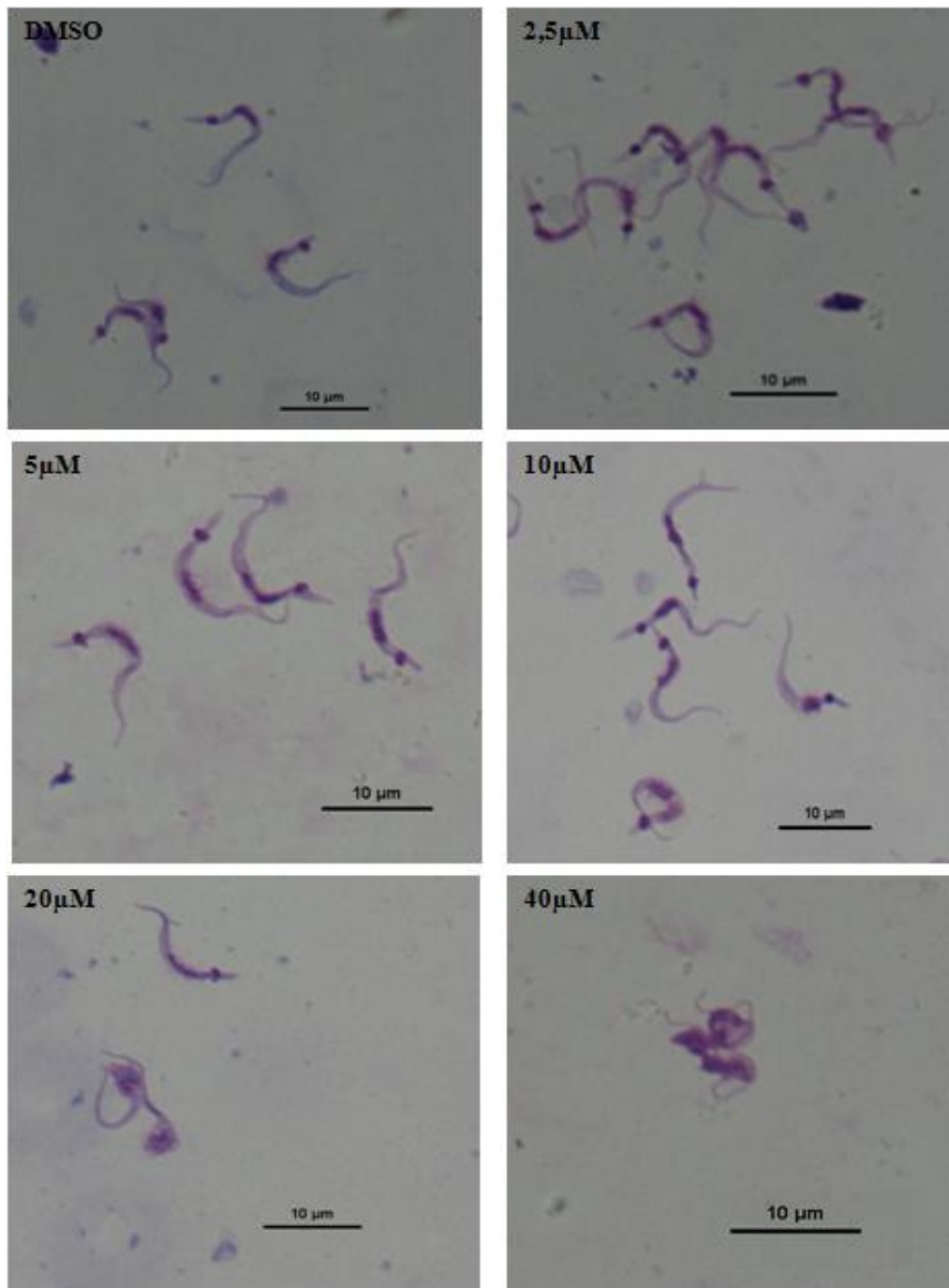
Para avaliar a ação da LQB-118 sobre as formas tripomastigotas, os parasitos foram isolados do sangue de camundongos *Swiss Webster* infectados durante o pico da infecção (7 dpi). Esses tripomastigotas sanguíneos foram tratados com diversas concentrações de LQB-118 por 24h a 37°C/5% CO₂ e a sua motilidade foi avaliada. Os resultados mostraram que, após 24 horas de tratamento, houve diminuição dose-dependente do número de tripomastigotas móveis a partir da concentração de 20 μ M de LQB-118, onde se observou a redução de 60% (p<0,01) seguido de 100% (p<0,0001) na concentração de 40 μ M, respectivamente, em relação ao controle (Figura 11A). A IC₅₀ relativa a inibição da motilidade em 24 horas foi estimada em 16,9 μ M \pm 1,6 (Figura 11). Foi observado também que tratamento a partir de 20 μ M de LQB-118 promoveu mudanças morfológicas com arredondamento do corpo celular (Figura 12).

Figura 11 - Efeito da LQB-118 sobre a motilidade de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Tripomastigotas sanguíneos foram incubados em triplicatas com diversas concentrações de LQB-118 por 24 horas em estufa a 37°C/5%CO₂. As células móveis foram contadas diariamente em câmara de Neubauer. Controles foram parasitos cultivados somente com meio de cultura contendo ou não DMSO a 0,013%. Contagem de tripomastigotas móveis em 24 horas de tratamento. **p<0,001; ***p<0,0001. One Way ANOVA (pós-teste Newman-Keuls). Gráficos representativos (n=4)

Figura 12 - Fotomicrografia de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* tratados por 24 horas com LQB-118



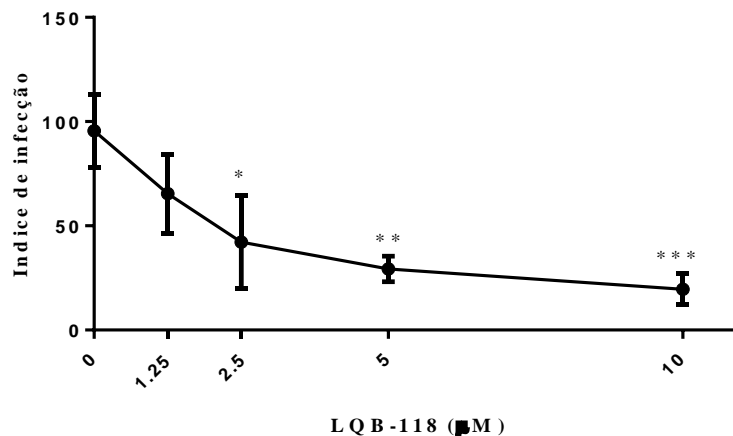
Legenda: Tripomastigotas (Y) foram incubadas em triplicata com a LQB-118 (0-40μM) por 24h/37°C/5%CO₂. A motilidade do parasito foi acompanhada com contagens diárias em câmara de Neubauer. Após 24h de tratamento os parasitos foram lavados, corados com Panótico, analisados e fotografados em microscopia de luz. Seta: forma compatível com amastigota. Aumento: 400x

Fonte: A autora, 2020.

3.1.3 Atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares

Para avaliar a ação da LQB-118 sobre formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, as monocamadas de macrófagos infectadas foram tratadas com diversas concentrações da pterocarpanoquinona por 48h. Os resultados indicam que houve diminuição do índice de infecção em 55,7% ($p < 0,01$), 69,3% ($p < 0,001$) e 79,5% ($p < 0,0001$) nas concentrações de 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente. A IC_{50} foi estimada em 3,96 μ M \pm 1,06 (Figura 13).

Figura 13 - Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*



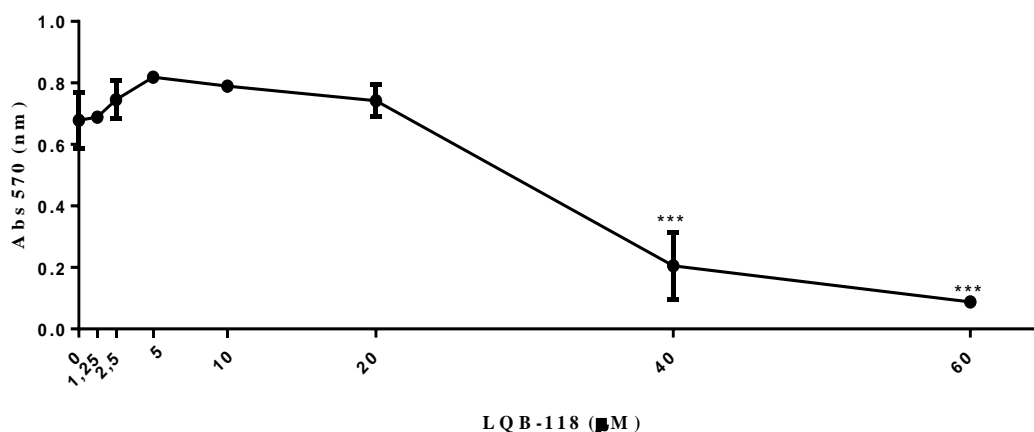
Legenda: Monocamada de macrófagos peritoneais foram aderidos *overnight* em placas de 24 poços a 37°C/5%CO₂, após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* por 10h a 37°C/5%CO₂, após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram tratadas com diversas concentrações de LQB-118 por 48h a 37°C/5%CO₂. Monocamadas foram coradas com Panótico e analisados em microscopia de luz. Controle: DMSO 0,0013%. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. One Way ANOVA (pós-teste Newman-Keuls). Gráfico representativo. (n=3)

3.2 Citotoxicidade da LQB-118 sobre macrófagos

A fim de verificar a toxicidade da pterocarpanoquinona LQB-118 em células de mamífero, monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss Webster* foram incubadas com diversas concentrações da LQB-118 a 37°C/5% CO₂ por 48h. Foi observada,

toxicidade significativa a partir de 40 μ M de LQB-118. A CC₅₀ foi estimada em 33,53 μ M \pm 2,37 (Figura 14). O índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀ de amastigota intracelular) foi 8,46.

Figura 14 - Citotoxicidade do pterocarpanoquinona LQB-118 sobre macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss Webster*



Legenda: Monocamada de macrófagos peritoneais foram aderidos por 24h em placas de 96 poços a 37°C/5%CO₂, após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram tratadas com diversas concentrações de LQB-118 por 43h a 37°C/5%CO₂ quando foi adicionado MTT (5mg/mL) por 5h a 37°C/5%CO₂, totalizando 48h de tratamento. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos com DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570nm. Controles: Células cultivadas com meio RPMI suplementado com SFB 10% com ou sem adição de DMSO (0,008%). ***p<0,0001. One Way ANOVA (pós-teste Newman-Keuls). Gráfico representativo (n=2).

3.3 Efeito Terapêutico da LQB-118 em camundongos infectados com *T. cruzi*

Para investigar o potencial terapêutico da LQB-118 na doença de Chagas experimental, avaliamos o efeito do tratamento em camundongos *Swiss Webster* (machos e fêmeas) infectados com *T. cruzi* nas fases aguda e crônica.

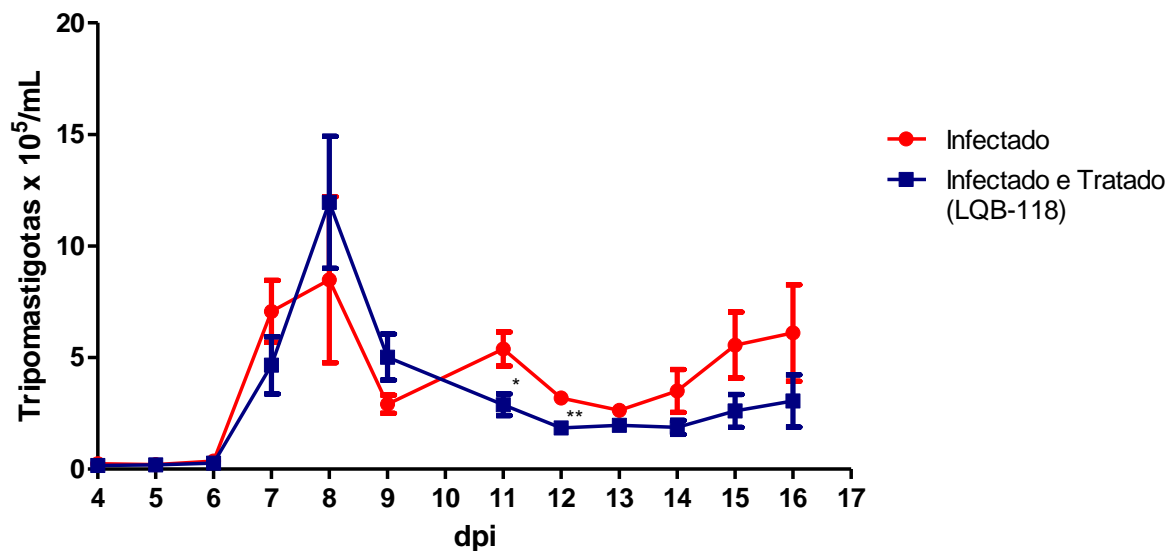
3.3.1 Fase aguda

Os camundongos (machos) foram tratados com a LQB-118 (40mg/Kg/dia) por via oral a partir do 4º dia pós-infecção (dpi) durante 12 (doze) dias consecutivos e a parasitemia foi

avaliada diariamente (Figura 15). Um dia após o final do tratamento (16° dpi) os animais foram eutanasiados e o coração foi removido para análise histopatológica.

Os resultados mostraram que o pico da parasitemia ocorreu no 8° dpi em ambos os grupos (infectados sem tratamento e infectados com tratamento). O grupo tratado apresentou um pico ligeiramente maior em relação ao grupo controle não tratado, contudo a partir do 11° dpi observou-se redução relativamente maior da parasitemia no grupo tratado, sendo significativa no 11° dpi (redução de 49%, $p < 0,02$) e no 12° dpi (redução de 41%, $p < 0,002$) (Figura 15).

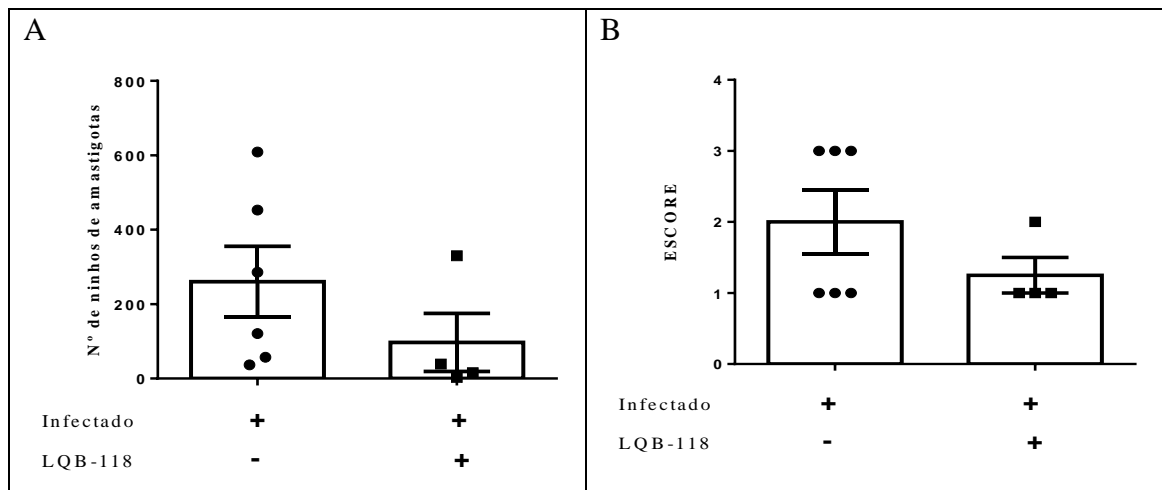
Figura 15 – Efeito do tratamento com LQB-118 na parasitemia em animais na fase aguda da infecção com *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (10-8 animais/grupo) infectados com tripomastigotas sanguíneas (10^3 cepa Y/animal) de *Trypanosoma cruzi*. (●) Animais infectados e não tratados; (■) Animais infectados e tratados com LQB-118 (40mg/Kg/dia) pela via oral por 12 dias consecutivos. ** $p < 0,002$ * $p < 0,02$. Teste t (Mann-Whitney test).

A análise histopatológica do coração foi avaliada por parâmetros quantitativos e por escore semiquantitativo. Em relação a presença de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, os resultados mostraram que o tratamento com a LQB-118 promoveu uma tendência na redução do número de ninhos de amastigotas, mas sem significância estatística (Figura 16A). O mesmo perfil foi observado pela análise semiquantitativa por escore (Figura 16B).

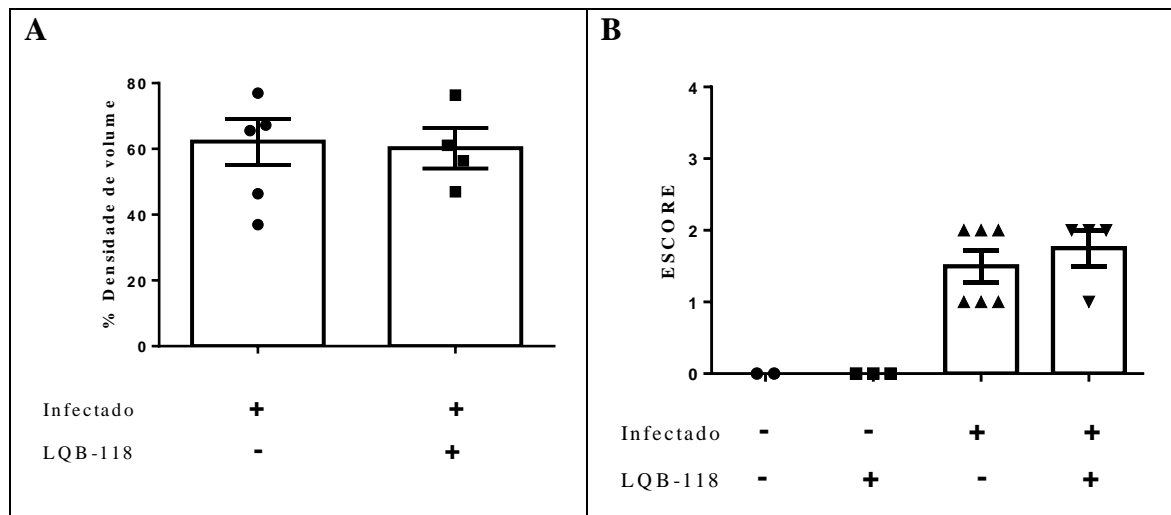
Figura 16 - Avaliação quantitativa e semiquantitativa dos ninhos de amastigotas no coração em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (4-6) machos foram infectados com tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (10^3 parasitos/animal), tratados ou não por 12 dias com LQB118 (40mg/Kg/dia) a partir do 4º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (16º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). A) contagem dos ninhos de amastigotas por lâmina. B) Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Test t (Mann-Whitney test) e Teste de Fischer's

A avaliação quantitativa através da estereologia (Figura 17A) e escore semiquantitativo (Figura 17B) do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco não mostrou diferença entre os grupos. Porém, os animais tratados com a LQB-118 apresentaram infiltrados inflamatórios pontuais, diferente dos animais não tratados, que apresentaram infiltrados inflamatórios mais extensos.

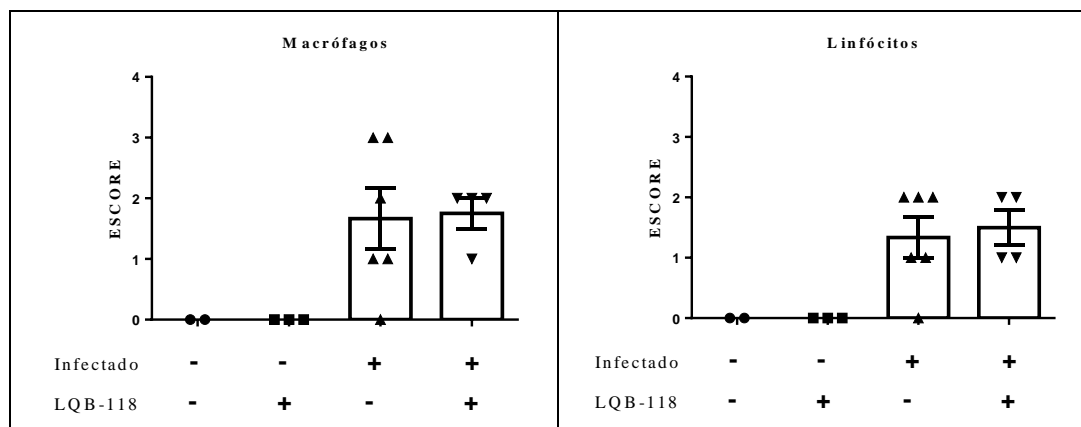
Figura 17 - Avaliação quantitativa e semiquantitativa do infiltrado inflamatório no coração em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118

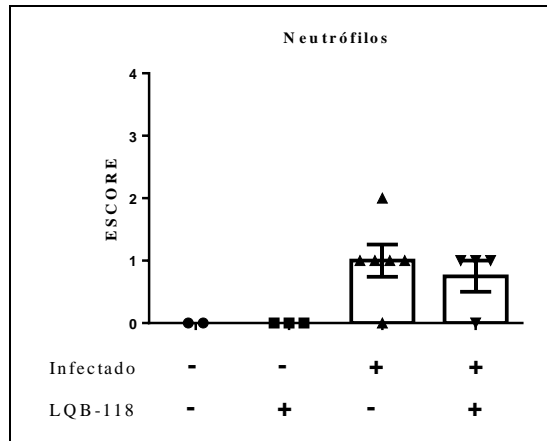


Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (4-6) machos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (10^3 parasitos/animal), tratados ou não por 12 dias com LQB-118 (40mg/Kg/dia) a partir do 4º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (16º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). A) Quantificação pelo método D36. B) Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Test t (Mann-Whitney test) e Teste de Fischer's

Em relação aos componentes celulares do infiltrado inflamatório o perfil foi semelhante entre os grupos. Houve predominância de macrófagos e linfócitos, porém não houve diferenças significativas entre os grupos controle não tratado e o grupo tratado com a LQB-118 (Figura 18).

Figura 18 - Avaliação semiquantitativa dos componentes celulares do infiltrado inflamatório no coração em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118

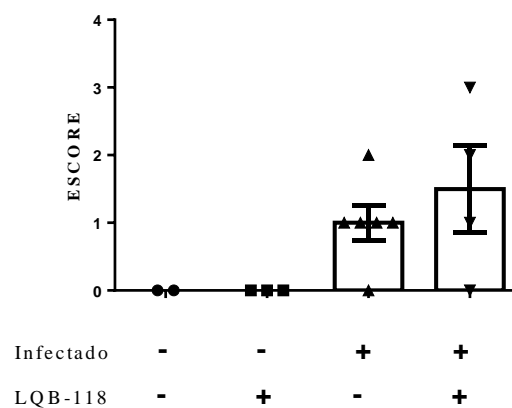




Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (4-6) machos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (10^3 parasitos/animal), tratados ou não por 12 dias com LQB-118 (40mg/Kg/dia) a partir do 4º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (16º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Teste de Fischer's

A avaliação semiquantitativa da degeneração de miócitos indicou um ligeiro aumento nos animais tratados em comparação com o grupo controle, porém não houve diferença estatística (Figura 19).

Figura 19 - Avaliação semiquantitativa da degeneração de miócitos em animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118

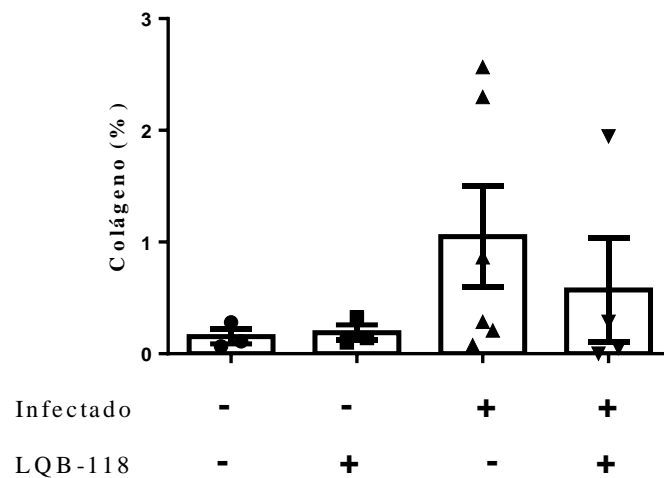


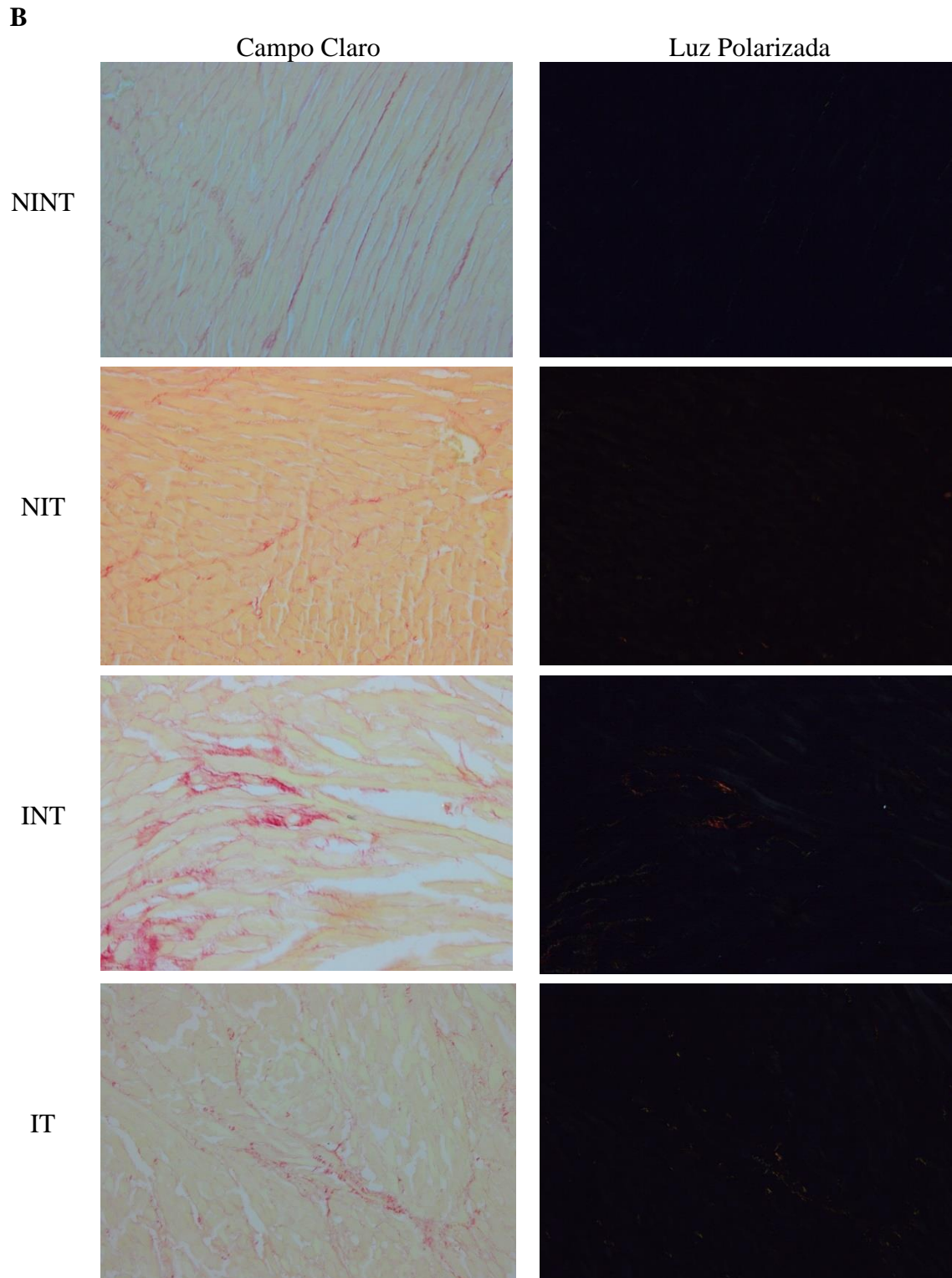
Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (4-6) machos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (10^3 parasitos/animal), tratados ou não por 12 dias com LQB-118 (40mg/Kg/dia) a partir do 4º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (16º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Teste de Fischer's

A quantificação do colágeno do tecido cardíaco foi realizada pela coloração com Picrosirius. A análise foi realizada em tecido cardíaco de animais infectados e não infectados. Os animais infectados apresentaram um aumento do percentual de colágeno em relação aos animais não infectados, porém não houve diferença estatística (Figura 20). Entre os animais infectados, os tratados com a LQB-118 apresentaram redução do percentual de colágeno em relação aos animais não tratados, porém não houve diferença estatística (Figura 20).

Figura 20 - Avaliação do percentual de colágeno no coração de animais na fase aguda da infecção tratados com LQB-118

A





Legenda: Camundongos *Swiss Webster* machos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (10^3 parasitos/animal), tratados ou não por 12 dias com LQB-118 (40mg/Kg/dia) a partir do 4º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (16º dpi) e os cortes do coração foram corados (Picosirius). A análise do percentual do colágeno foi realizada através do programa ImagePro, por meio da polarização da luz de lâminas coradas. A) Percentual da quantificação de colágeno. B) Fotomicrografia do colágeno. NINT: animais não infectados e não tratados; NIT: animais não infectados e tratados; INT: animais infectados e não tratados; IT: animais infectados e tratados. Test t (Mann-Whitney test). Aumento: 400x. (n=16)

Fonte: A autora, 2020.

3.3.2 Fase crônica

Para estudar o efeito do tratamento com a LQB-118 na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, primeiramente foi necessário otimizar e padronizar o protocolo experimental de infecção para estabelecer essa fase da doença.

3.3.2.1 Determinação da susceptibilidade entre macho e fêmea de camundongos *Swiss Webster* para a infecção com *Trypanosoma cruzi* e estabelecimento da fase crônica

Dada as diferenças de susceptibilidade entre os gêneros de camundongos *Swiss Webster* para a infecção com o *T. cruzi* (CASTRO; SOUZA, 2000), foi importante determinar qual seria o gênero, assim como o inóculo de parasitos, mais adequados para estabelecer a fase crônica. Os camundongos *Swiss Webster* (19 fêmeas e 18 machos) foram infectados com 40, 100 e 500 tripomastigotas sanguíneos por via intraperitoneal e a parasitemia e parâmetros clínicos foram avaliados por 30 dpi (dias pós-infecção).

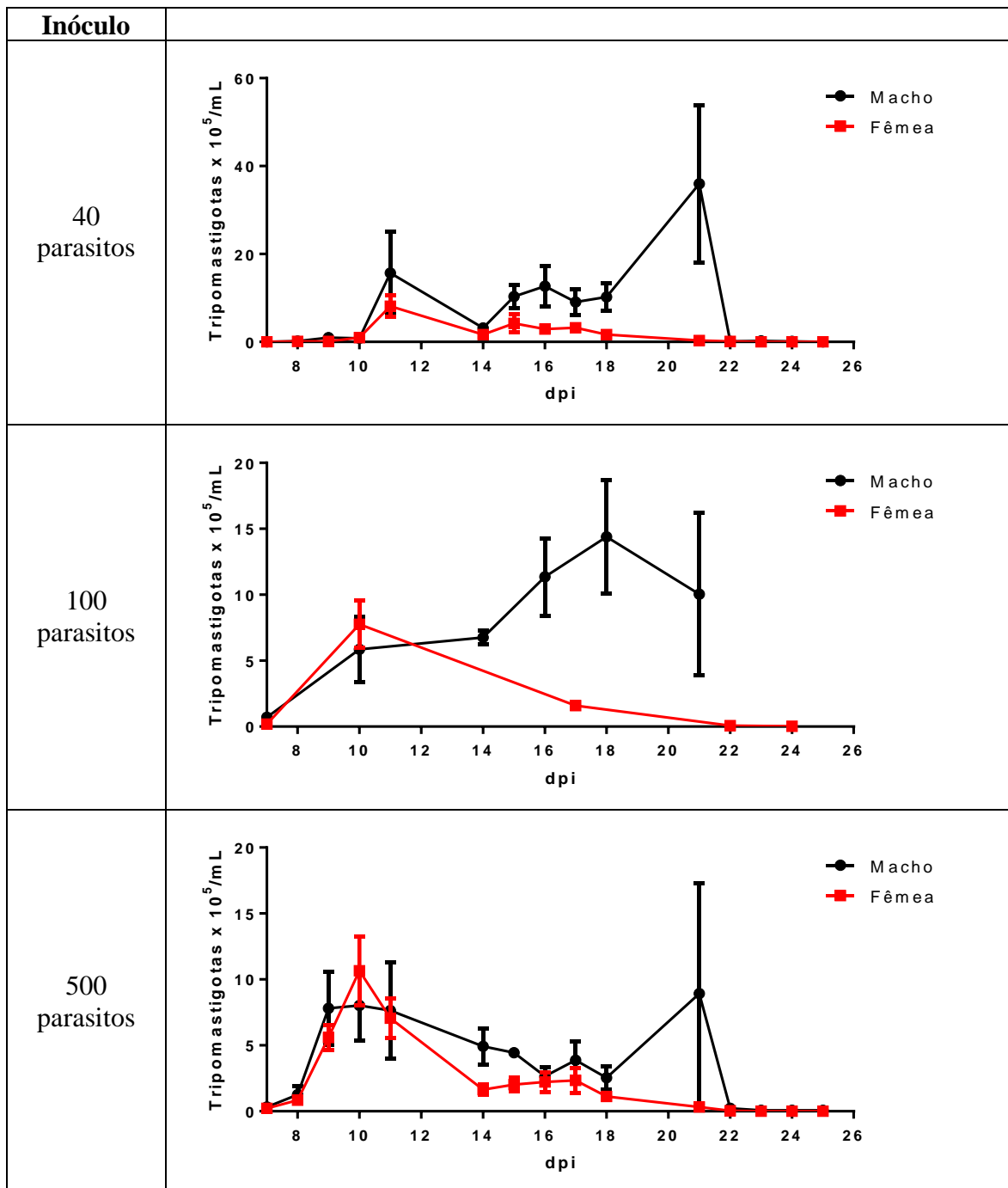
3.3.2.1.1 Perfil da curva de parasitemia entre os gêneros de camundongos *Swiss Webster*

De modo geral, os animais infectados apresentaram parasitemia positiva após 7 (sete) dias de infecção. Os camundongos machos apresentaram, quantitativamente, parasitemia maior em comparação com as fêmeas. Quanto ao comportamento da curva de parasitemia em relação aos inóculos, as fêmeas apresentaram a parasitemia com picos no 11º dpi (inóculo de 40 parasitos/ animal) e no 10º dpi (inóculo de 500 ou 100 parasitos/animal). Entretanto, nas fêmeas infectadas com 40 tripomastigotas houve um segundo pico (porém menos intenso) de parasitemia no 15º dpi (Figura 21).

Já os machos apresentaram diferentes picos de parasitemia durante a curso da infecção, infectados com 40 tripomastigotas apresentaram dois picos de parasitemia: um por volta do 11º dpi e outro no do 21º dpi, com o inóculo de 100 tripomastigotas foi observado

um aumento gradativo da parasitemia com maior pico no 18º dpi; nos machos infectados com 500 tripomastigotas foi observado picos de parasitemia do 10º dpi e no 21º dpi (Figura 21).

Figura 21 - Avaliação da parasitemia de camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas usando inóculos diferentes de *Trypanosoma cruzi*

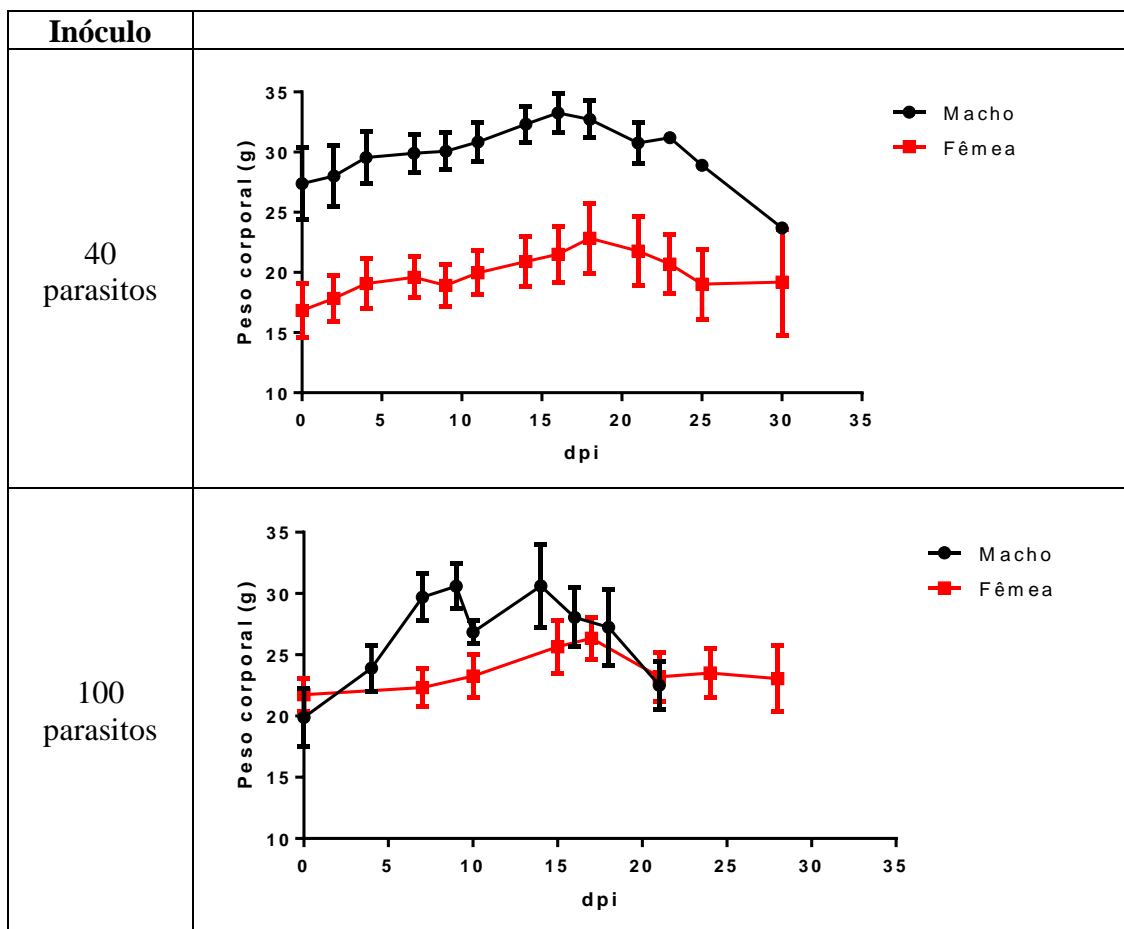


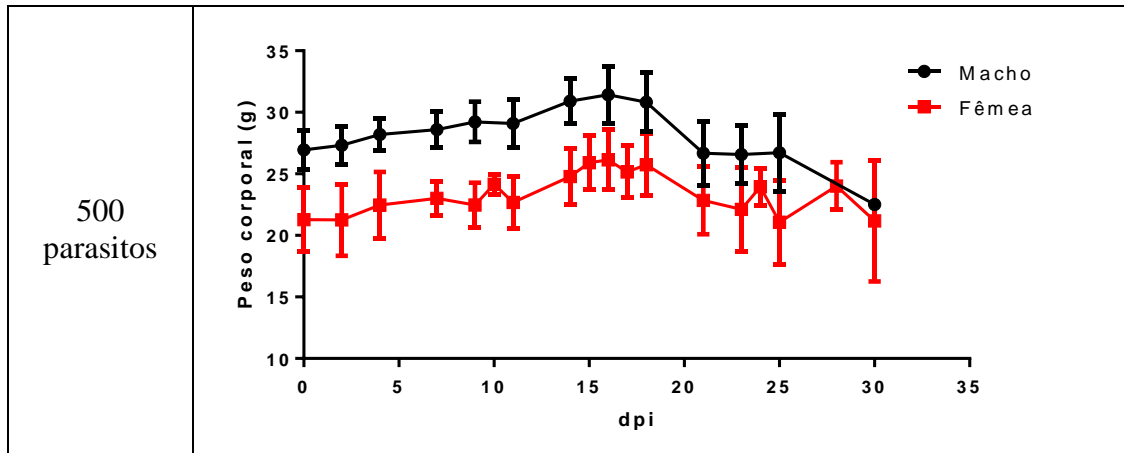
Legenda: Os camundongos *Swiss Webster* foram infectados com 40, 100 ou 500 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* e a parasitemia foi avaliada diariamente até o dia em que não houve detecção de parasito no sangue dos animais pelo método de Pizzi-Brener. Os resultados foram expressos como média \pm SD de três 3 experimentos independentes.

3.3.2.1.2 Peso e temperatura corporal

O peso e a temperatura dos animais infectados foram avaliados em dias alternados durante a infecção. Nos camundongos machos houve um ganho de peso até o 15º dpi e após esse período foi observado uma queda progressiva (Figura 22). Não foi possível avaliar o peso dos animais com inóculo de 100 tripomastigotas até o 30º dpi devido ao óbito dos mesmos. As fêmeas também apresentaram um aumento de peso até o 18º dpi, seguida de perda de peso, porém com uma estabilização do mesmo até o 30º dpi (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação do peso de camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*

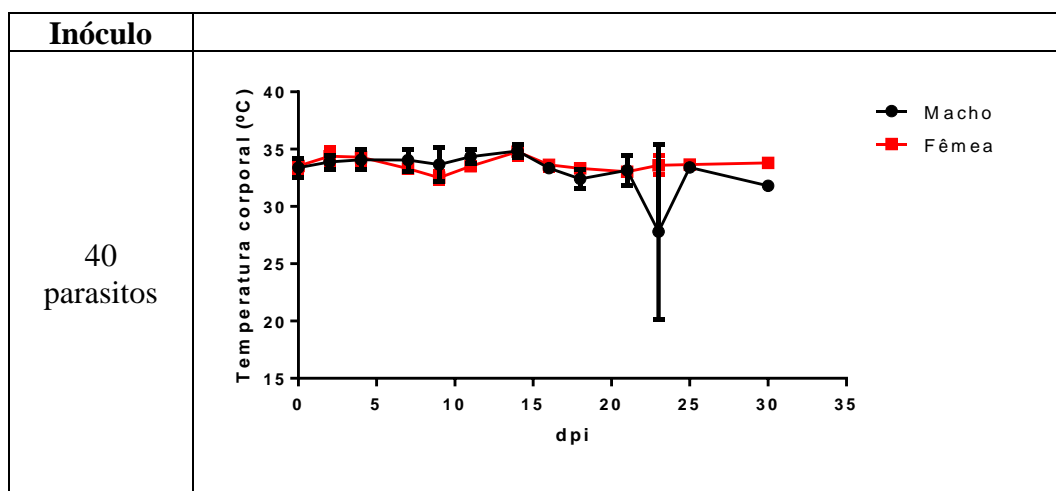


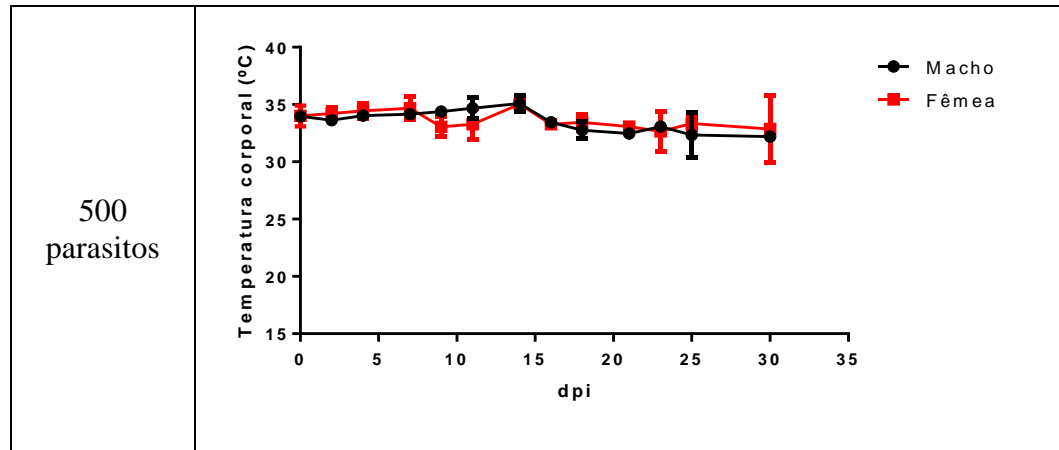


Legenda: Camundongos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos (40; 100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, a avaliação do peso corporal foi realizada através da pesagem dos camundongos utilizando balança de precisão. Os animais foram pesados em dias alternados até o 30° dpi. Os gráficos representam a média da pesagem de cada grupo. A) Peso dos camundongos *Swiss Webster* machos. B) Peso dos camundongos *Swiss Webster* fêmeas. Os resultados foram expressos como média \pm SD de três 3 experimentos independentes

Em relação a variação da temperatura corporal, tanto os camundongos machos como as fêmeas apresentaram pequenas flutuações ao longo do tempo de infecção, sem diferenças significativas (Figura 23).

Figura 23 - Avaliação da temperatura de camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*





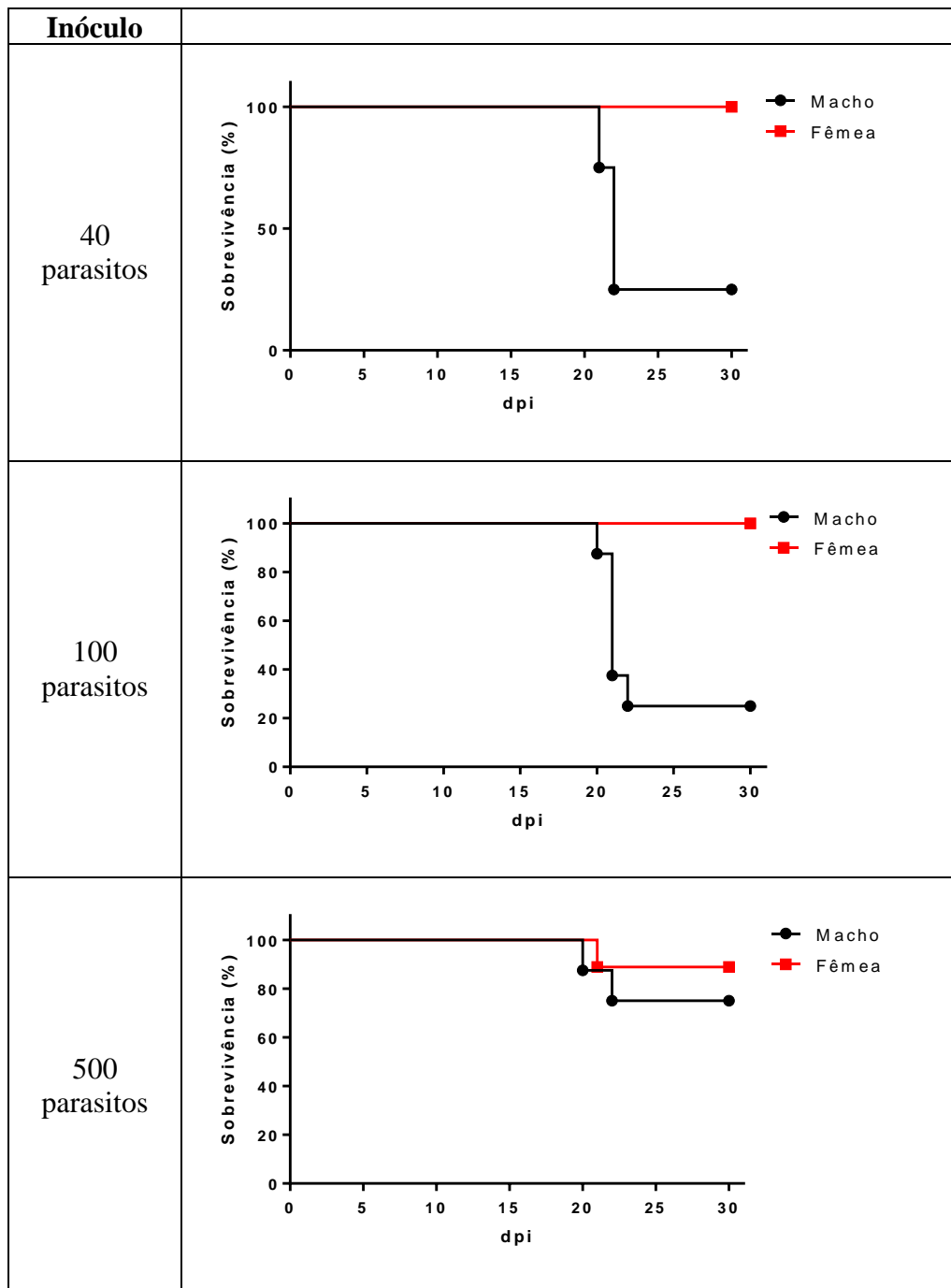
Legenda: Camundongos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos (40 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, a temperatura corporal foi aferida utilizando um termômetro de superfície em dias alternados até o 30º dpi. A) Temperatura dos camundongos *Swiss Webster* machos. B) Temperatura dos camundongos *Swiss Webster* fêmeas. Os resultados foram expressos como média \pm SD de três 3 experimentos independentes

3.3.2.1.3 Ensaio de Sobrevivência

A sobrevivência dos animais durante a fase aguda e avançando para a fase crônica da infecção, foi avaliada por registros diários do número de óbitos ao longo do experimento. Os camundongos machos com inóculo de 100 e 40 tripomastigotas apresentaram alta mortalidade a partir do 21º dpi, com mortalidade de 75% (6 de 8 animais) e 75% (3 de 4 animais) respectivamente, enquanto que nesse mesmo período nos animais infectados com inóculo de 500 tripomastigotas, a mortalidade foi de 25% (2 de 8 animais) respectivamente (Figura 24).

Nas fêmeas, o único grupo que apresentou óbito foi o dos animais inoculados com 500 tripomastigotas, onde no 21º dpi, a mortalidade foi de 11% (1 de 9 animais). Nos demais grupos a sobrevivência das fêmeas foi de 100% (Figura 24).

Figura 24 - Avaliação da sobrevivência de camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*

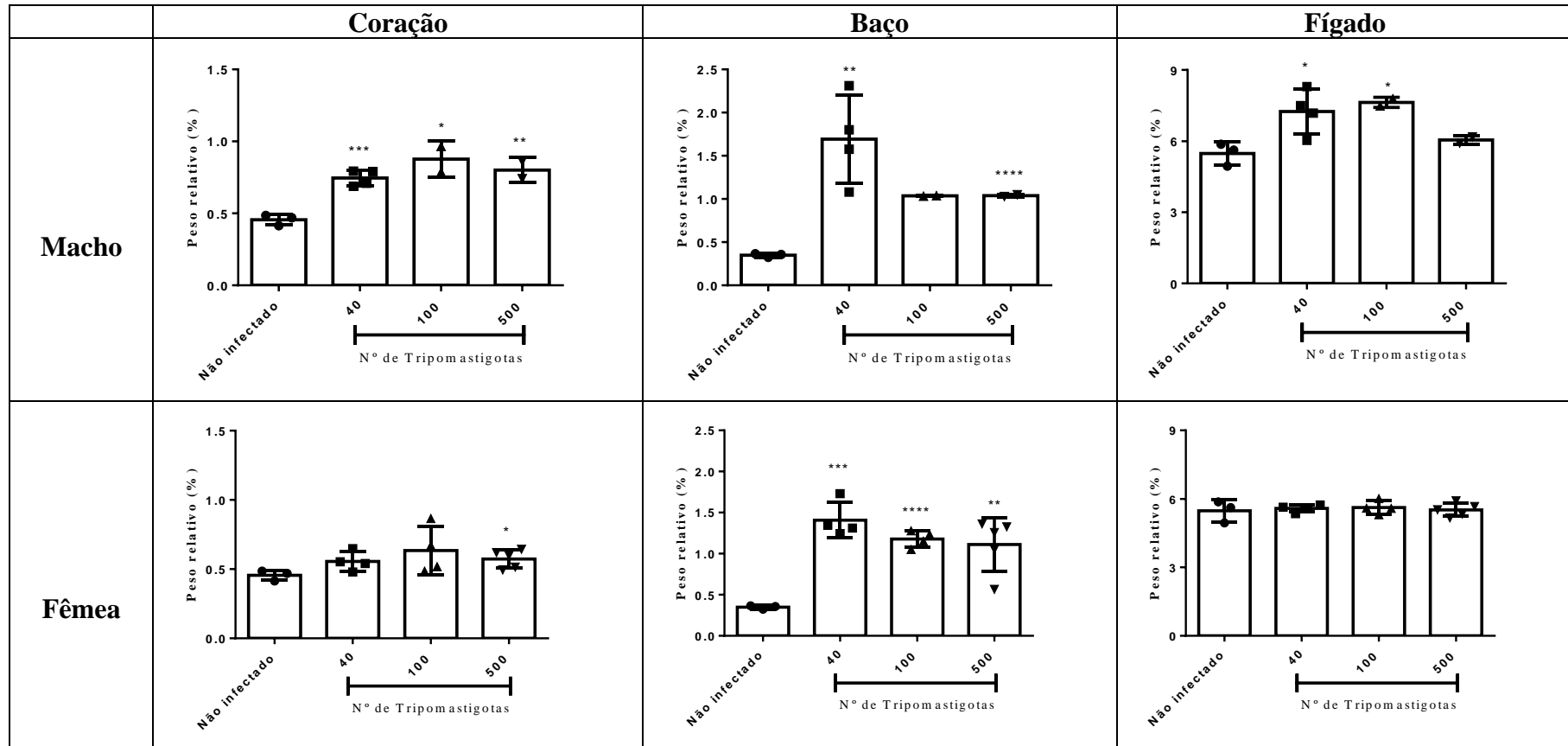


Legenda: Camundongos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos (40; 100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, a avaliação da sobrevivência foi realizada através da observação diária dos animais até o 30º dpi. Os gráficos representam a percentagem acumulativa dos animais vivos. A) Sobrevivência dos camundongos *Swiss Webster* machos. B) Sobrevivência dos camundongo *Swiss Webster* fêmeas. (n=3)

3.3.2.1.4 Pesagem dos órgãos

Entre as principais alterações da doença de Chagas, encontram-se a hepatoesplenomegalia e a hipertrofia cardíaca (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Sendo assim, avaliamos a ocorrência de variação nos pesos do coração, fígado e baço dos camundongos infectados ao final do experimento. Devido a alta mortalidade entre os camundongos *Swiss Webster* machos infectados com inóculos de 100 e 500 tripomastigotas, não foi possível realizar uma comparação estatística entre esses grupos (Figura 25), porém é possível observar que a infecção promoveu aumento relativo de todos os três órgãos em relação aos animais não infectados. Entre as fêmeas, o grupo infectado com 500 tripomastigotas apresentou o peso relativo aumentado do coração e do baço em relação aos animais não infectados (Figura 25), enquanto o fígado não apresentou alteração (Figura 25).

Figura 25 - Peso relativo do coração, baço e fígado de camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos foram infectados ou não com tripomastigotas sanguíneos (40; 100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados ao fim de 30º dpi, pesados e seus órgãos retirados e pesados em uma balança de precisão. O peso relativo dos órgãos foi calculado considerando o peso corporal de cada animal. A-C) Peso relativo dos órgãos de camundongos *Swiss Webster* machos. D-F) Peso relativo dos órgãos de camundongos *Swiss Webster* fêmeas. * $p < 0,03$. Teste T (Mann-Whitney test).

3.3.2.2 Avaliação de parâmetros físicos, comportamentais e de sobrevivência de camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectados com diferentes inóculos do *Trypanosoma cruzi*

Uma vez que as fêmeas se mostraram mais resistentes em sobreviver a fase aguda da infecção (até 30 dpi), elas foram consideradas aptas para os estudos de fase crônica. Para melhor estabelecer o modelo alguns parâmetros físicos e comportamentais, assim como a avaliação da sobrevivência desses animais em tempos maiores de infecção foram avaliados usando dois inóculos na infecção: 100 e 500 tripomastigotas.

Todos os animais infectados apresentaram parasitemia positiva após 7 dpi (Tabela 3). Após 45 dpi foi avaliando novamente a parasitemia dos animais e não foram encontrados parasitos no sangue. Ao fim de 126 dias de infecção, os animais foram eutanasiados.

Tabela 3 - Parasitemia de camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectadas com diferentes inóculos de *T. cruzi*

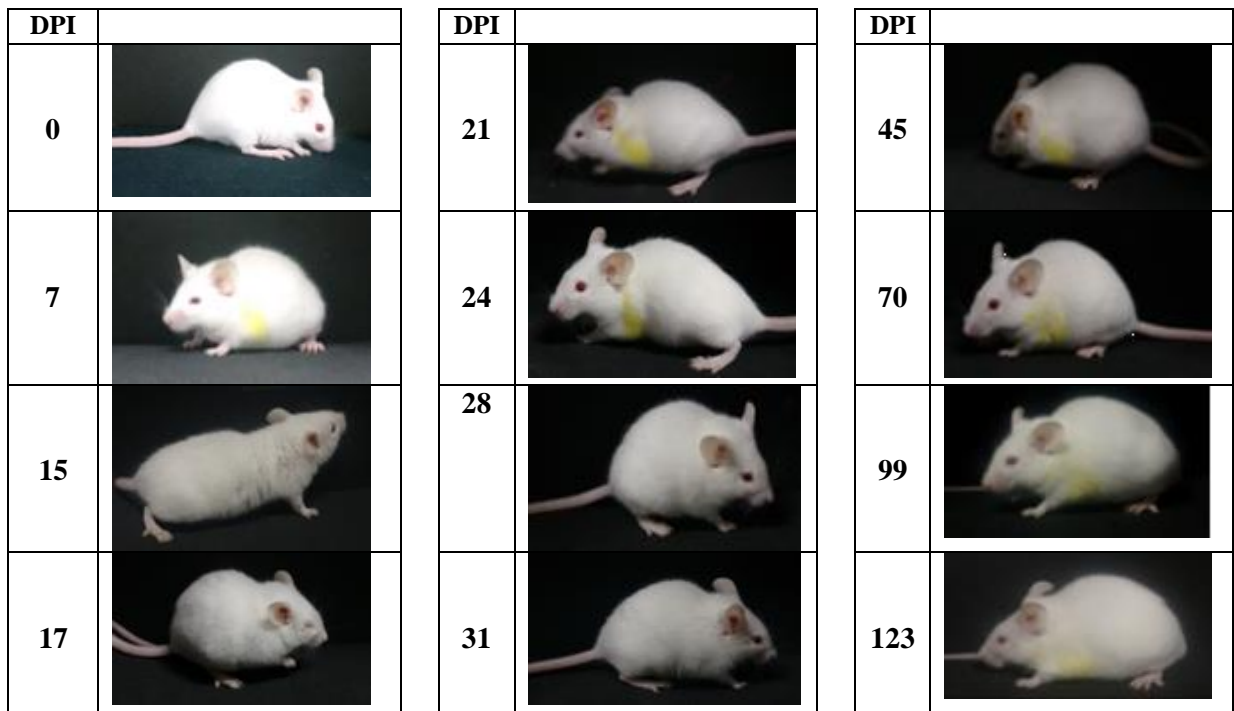
Parasitemia	Inóculo (nº de tripomastigotas)	
	100	500
7ºdpi	3/3 (100%)	3/3 (100%)
45º dpi	0/3 (0%)	0/2 (0%)

Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas foram infectados com tripomastigotas sanguíneos (100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*. A avaliação da parasitemia e o registro do número de óbitos foram realizados.

Fonte: A autora, 2020

A partir do 15º dpi foram observadas modificações físicas e comportamentais nos animais. Todos os animais apresentaram piloereção, postura anormal (corpo curvado) (Figura 26) e pouca locomoção, em como diminuição do peso corporal (Figura 27). A partir do 28º dpi, observamos recuperação progressiva em relação aos parâmetros físicos e comportamentais. Os animais deixaram de apresentar a piloereção, melhorando a postura (Figura 28), ficaram mais ativos e aumentaram o peso corporal (Figura 27) não havendo diferença entre os inóculos avaliados.

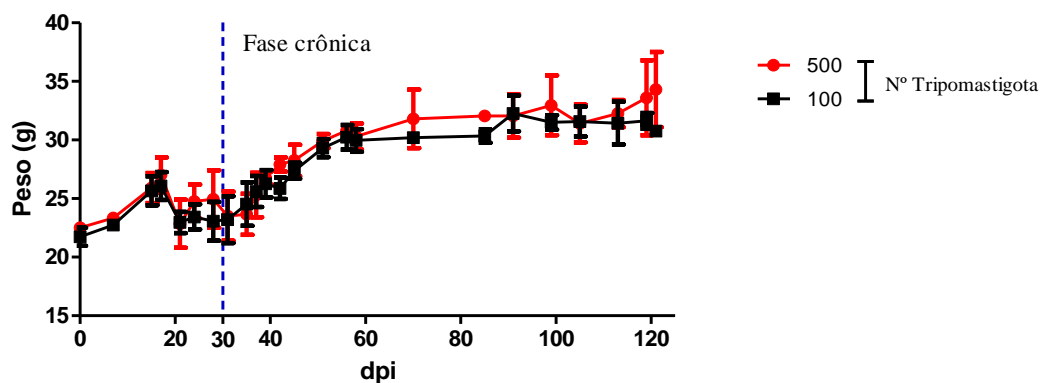
Figura 26 - Aspecto físico dos camundongos *Swiss Webster* fêmeas ao longo da infecção com *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmea foram infectados com 500 tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y. Os camundongos foram observados e o registro fotográfico do aspecto físico realizado, antes da infecção (0 dpi), durante a fase aguda (até 30° dpi) e a fase crônica (partir de 31° dpi) da infecção. As fotografias apresentadas são representativas dos animais ao longo do período avaliado. DPI: dia pós-infecção.

Fonte: A autora, 2020

Figura 27 - Peso corporal de camundongos *Swiss Webster* fêmeas ao longo da infecção com *Trypanosoma cruzi*

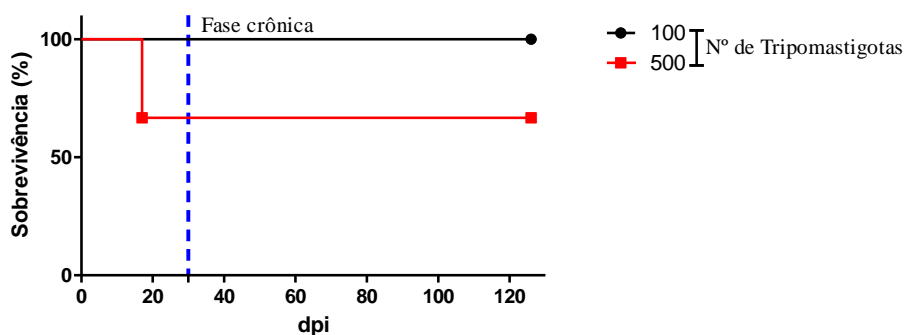


Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas foram infectados com tripomastigotas sanguíneas (100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*. A avaliação do peso corporal foi realizada por

pesagem (a cada dois dias) dos camundongos utilizando uma balança de precisão.

Quanto a sobrevivência, um animal do grupo inoculado com 500 tripomastigotas (1/3) foi ao óbito no 17º dpi, os demais sobreviveram até o fim do (Figura 28).

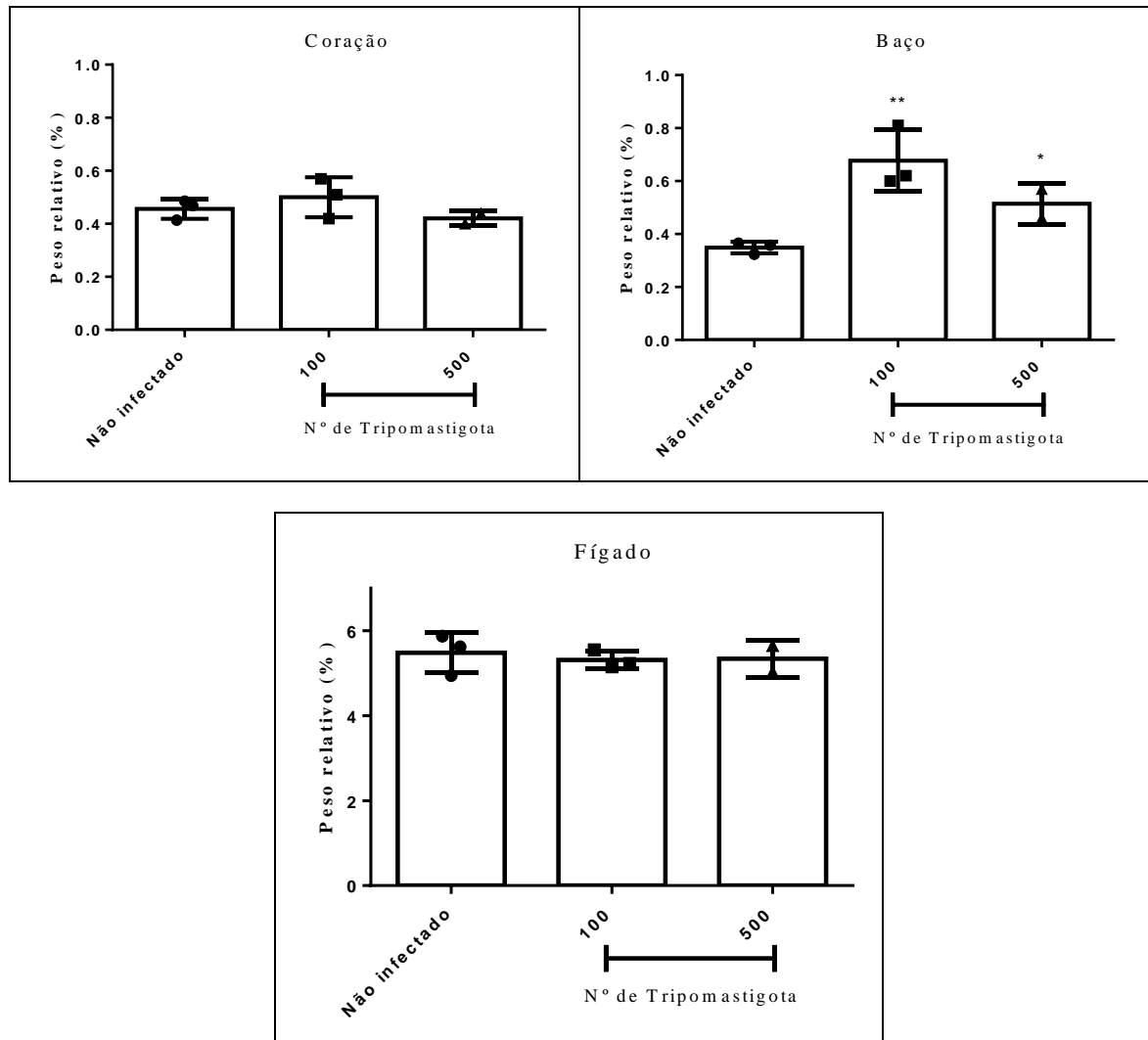
Figura 28 - Avaliação da sobrevivência de camundongos *Swiss Webster* fêmeas ao longo da infecção com *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (3 animais/grupo) foram infectados com tripomastigotas sanguíneos (100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, a avaliação da sobrevivência foi realizada por observação diária dos animais até o 126º dpi.

Ao final do experimento (126 dpi), os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, fígado e baço) foram pesados. Não foi observada diferença estatística entre o peso do coração e fígado dos animais infectados com os diferentes inóculos e entre esses e os não infectados (Figura 29A e C). Já o baço dos animais infectados houve uma aumento de 108% (inóculo de 100 parasitos) e 58% (inóculo de 500 parasitos) em comparação aos animais não infectados.

Figura 29 - Peso relativo do coração, baço e fígado de camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos foram infectados com tripomastigotas sanguíneos (100 ou 500 tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados ao fim de 126° dpi, pesados e seus órgãos retirados e pesados em uma balança de precisão. O peso relativo dos órgãos foi calculado considerando o peso corporal de cada animal.

3.3.2.3 Tratamento de camundongos *Swiss Webster* fêmeas com LQB-118 no início da fase crônica

3.3.2.3.1 Determinação do início da fase crônica antes do tratamento

Para esse ensaio, foram infectados 25 camundongos *Swiss Webster* fêmeas, por via intraperitoneal, com 100 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*. A parasitemia foi avaliada diariamente a partir do 4º dpi não ser mais detectada. Dos 25 camundongos, 2 (8%) apresentaram parasitemia negativa até o 7º dpi, assim como na reavaliação no 18º dpi e foram retirados do ensaio. Dos 23 camundongos com parasitemia positiva, 4 (17,4%) foram ao óbito antes do início da fase crônica (30º dpi). Entre os 19 camundongos que iniciaram a fase crônica, não foi observado óbito até o fim do experimento (45º dpi) (Tabela 4).

Tabela 4 – Parasitemia e mortalidade nas fases aguda e crônica da infecção

	Fase Aguda	Fase Crônica
Parasitemia	23/25 (92%)	-
Mortalidade	4/23 (17,4%)	0/19 (0%)

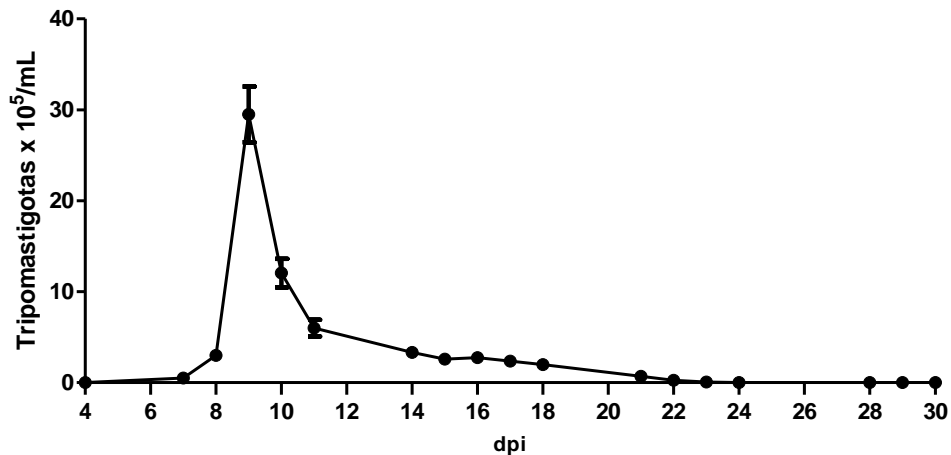
Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas (25 animais) foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (100 parasitos/animal). A avaliação da parasitemia e o registro do número de óbitos foram realizados diariamente até o 30º dpi. dpi: dias pós-infecção

Fonte: A autora, 2020.

3.3.2.3.2 Perfil da Curva de Parasitemia dos animais

A parasitemia foi avaliada diariamente a partir do 4º dpi até não ser mais observado parasito circulante no sangue periférico. Iniciada a fase crônica (30º dpi) a parasitemia não foi mais avaliada. Os animais infectados apresentaram picos de parasitemia no 9º dpi, diminuindo progressivamente até o 30º dpi onde nenhum animal apresentava parasito circulante no sangue (Figura 30).

Figura 30 - Perfil da curva de parasitemia de camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectados *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas foram infectados com 100 tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* e a parasitemia foi avaliada diariamente até o 30º dpi. Os resultados foram expressos como média \pm SD, n=23

3.3.2.3.3 Avaliação do tratamento com a LQB-118

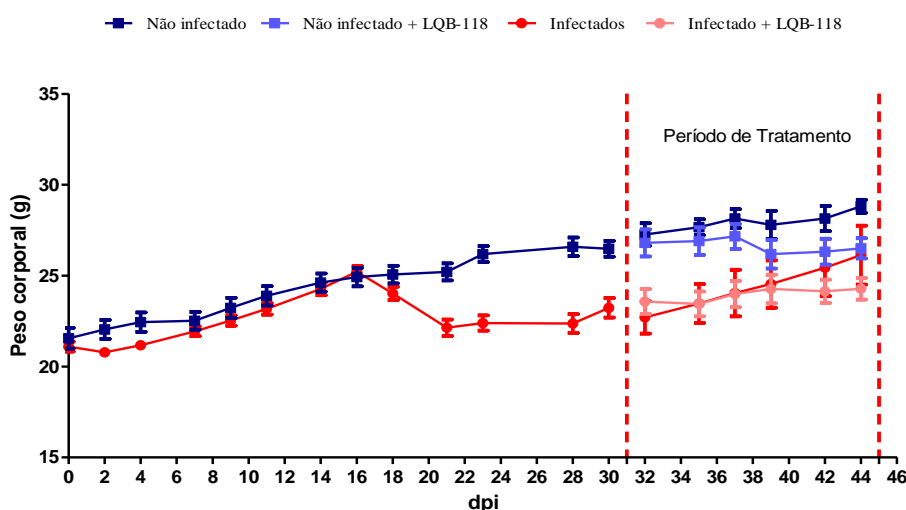
No 31º dpi os animais infectados foram divididos em 2 grupos: Animais infectados e não tratados (n=10); Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia por via oral por 15 dias consecutivos (n=9). Animais não infectados foram usados como controles e foram divididos em 2 grupos: Animais não infectados e não tratados (n=5) e Animais não infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia por via oral por 15 dias consecutivos (n=5)..

3.3.2.3.4 Avaliação clínica

Os parâmetros comportamentais, assim como alguns parâmetros clínicos como peso e temperatura corporal foram avaliados durante todo o ensaio (a fase aguda e crônica da infecção). Em relação ao peso corporal, os camundongos infectados apresentaram uma

diminuição do seu peso a partir de 18° dpi, sendo significativa a partir do 21° ($p<0,001$) em relação ao grupo não infectado (Figura 31). A partir do 30° dpi, quando os animais foram divididos em grupos para início do tratamento com a LQB-118, foi observado que os animais infectados (tratados ou não) continuaram a apresentar menor peso em relação aos animais não infectados (tratados ou não) até o 37° dpi. A partir do 37° dpi, entre os animais não infectados, o grupo tratado com a LQB-118 (7 dias de tratamento) apresentou peso relativamente menor que os animais não tratados, sendo essa diferença significativa com 44° dpi ($p<0,01$) (Figura 31). Em relação aos grupos infectados, foi observado uma estabilização do peso nos animais tratados com a LQB-118 e um aumento de peso nos animais não tratados (Figura 31).

Figura 31 - Avaliação do peso de camundongos *Swiss Webster* fêmeas submetidos ou não a infecção com *Trypanosoma cruzi* e tratamento com LQB-118

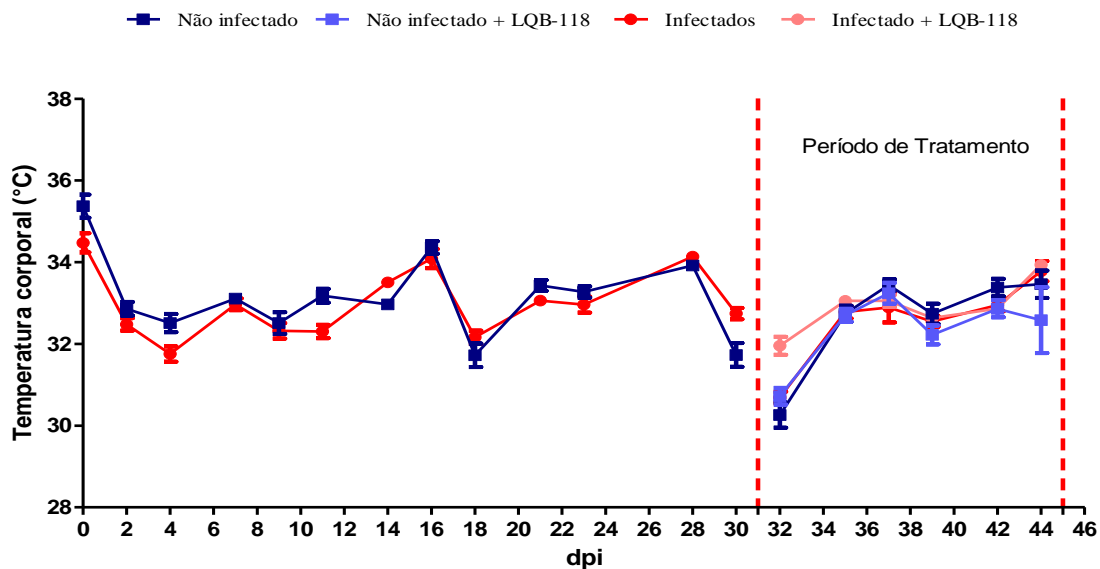


Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas foram ou não infectados com 100 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*. Grupos controles foram animais não infectados (5 animais). A avaliação do peso corporal foi realizada em dias alternados utilizando uma balança de precisão. Os animais infectados e não infectados foram subdivididos a partir do 30° dpi, em grupos tratados e não tratados: (1) Infectado (n=10), (2) Infectado + LQB-118 (n=9), (3) Não infectado (n=5) e (4) Não infectado + LBQ-118 (n=5). O tratamento dos animais com LQB-118 (20mg/Kg) 2x/dia por via oral foi iniciado no 31° dpi até o 45° dpi. Os resultados foram expressos como média \pm SD, ** $p<0,001$ * $p<0,01$ em relação ao Controle (Animais não infecção e sem tratamento). Teste t (Mann-Whitney test). (n=29)

Com relação a avaliação da temperatura corporal, houve algumas pequenas oscilações entre os grupos ao longo do período. Os animais infectados apresentaram diminuição da temperatura corporal significativa no 4° ($p<0,01$) e 11° dpi ($p<0,001$) e aumento da temperatura no 30° dpi ($p<0,001$) em relação com os animais não infectados (Figura 32).

Após início do tratamento (31° dpi), a temperatura se estabilizou e não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 32).

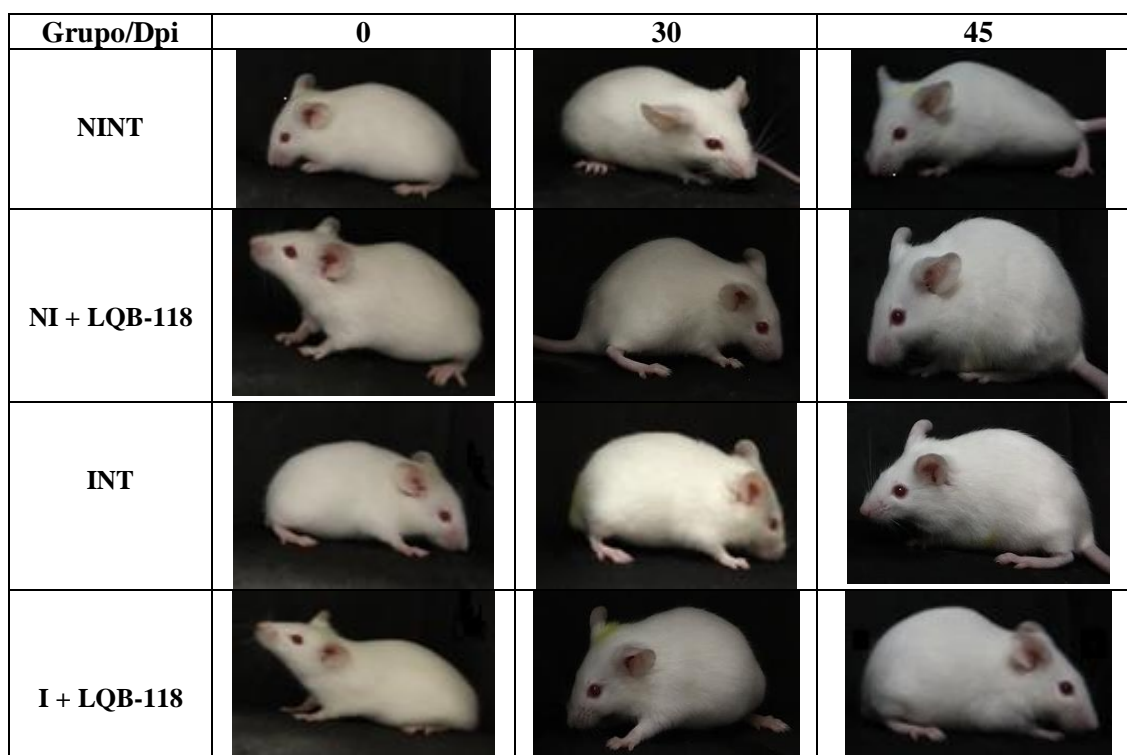
Figura 32 - Avaliação da temperatura corporal de camundongos *Swiss Webster* fêmeas submetidos ou não a infecção com *Trypanosoma cruzi* e tratamento com a LQB-118



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas foram infectados com 100 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*. Grupos controles foram animais não infectados (5 animais). A avaliação da temperatura corporal foi realizada em dias alternados utilizando um termômetro de superfície. Os animais infectados e não infectados foram subdivididos a partir do 30° dpi, em grupos tratados e não tratados: (1) Infectado (n=10), (2) Infectado + LQB-118 (n=9), (3) Não infectado (n=5) e (4) Não infectado + LBQ-118 (n=5). O tratamento dos animais com LQB-118 (20mg/Kg) 2x/dia por via oral foi iniciado no 31° dpi até o 45° dpi. Os resultados foram expressos como média \pm SD, **p<0,001 *p<0,01. Teste t (Mann-Whitney test). (n=29)

Os camundongos infectados apresentaram as mesmas modificações físicas e comportamentais observadas anteriormente no estabelecimento do modelo (Figura 26). A partir do 25°/28° dpi ocorreu progressivamente recuperação da postura e da motilidade dos animais. Ao longo do tratamento não foram observadas modificações físicas ou comportamentais entre os grupos (Figura 33).

Figura 33 - Fotografias dos camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*

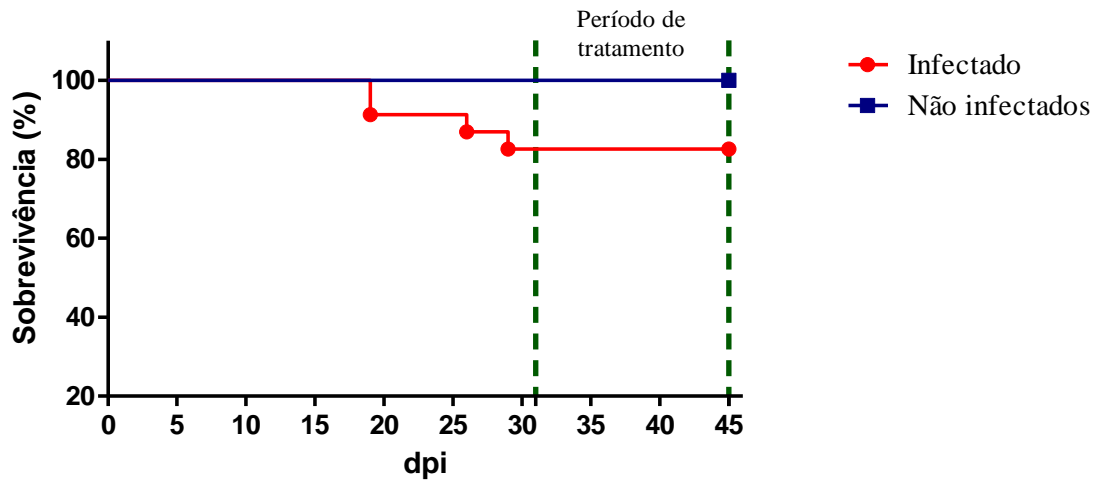


Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas foram infectados com 100 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Grupos controles foram animais não infectados (5 animais). A avaliação do comportamento e aparência física foram realizadas diariamente através da observação e registros fotográficos. DPI: dia pós-infecção; NINT: Animais não infectados e não tratados; NI + LQB-118: Animais não infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg) 2x/dia por via oral; INT: Animais infectados não tratados; I + LQB-118: Animais infectados e tratados com LQB-118 (20mg/Kg) 2x/dia por via oral. Imagens representativas de cada grupo. (n=29)

3.3.2.3.5 Avaliação da Sobrevivência

Em relação a sobrevivência, dos 23 camundongos fêmeas infectadas utilizados, 4 foram ao óbito, sendo 2 entre o 19° e o 20° dpi e os outros 2 no 26° e no 29° dpi, totalizando 17,4 % de mortalidade durante a fase aguda da infecção (Figura 36). A partir do 31° dpi, quando os animais foram divididos em grupos e iniciado o tratamento até 45° dpi, não foram registrados óbitos (Figura 34).

Figura 34 - Avaliação da sobrevivência antes e durante o tratamento com LQB-118 nos animais infectados

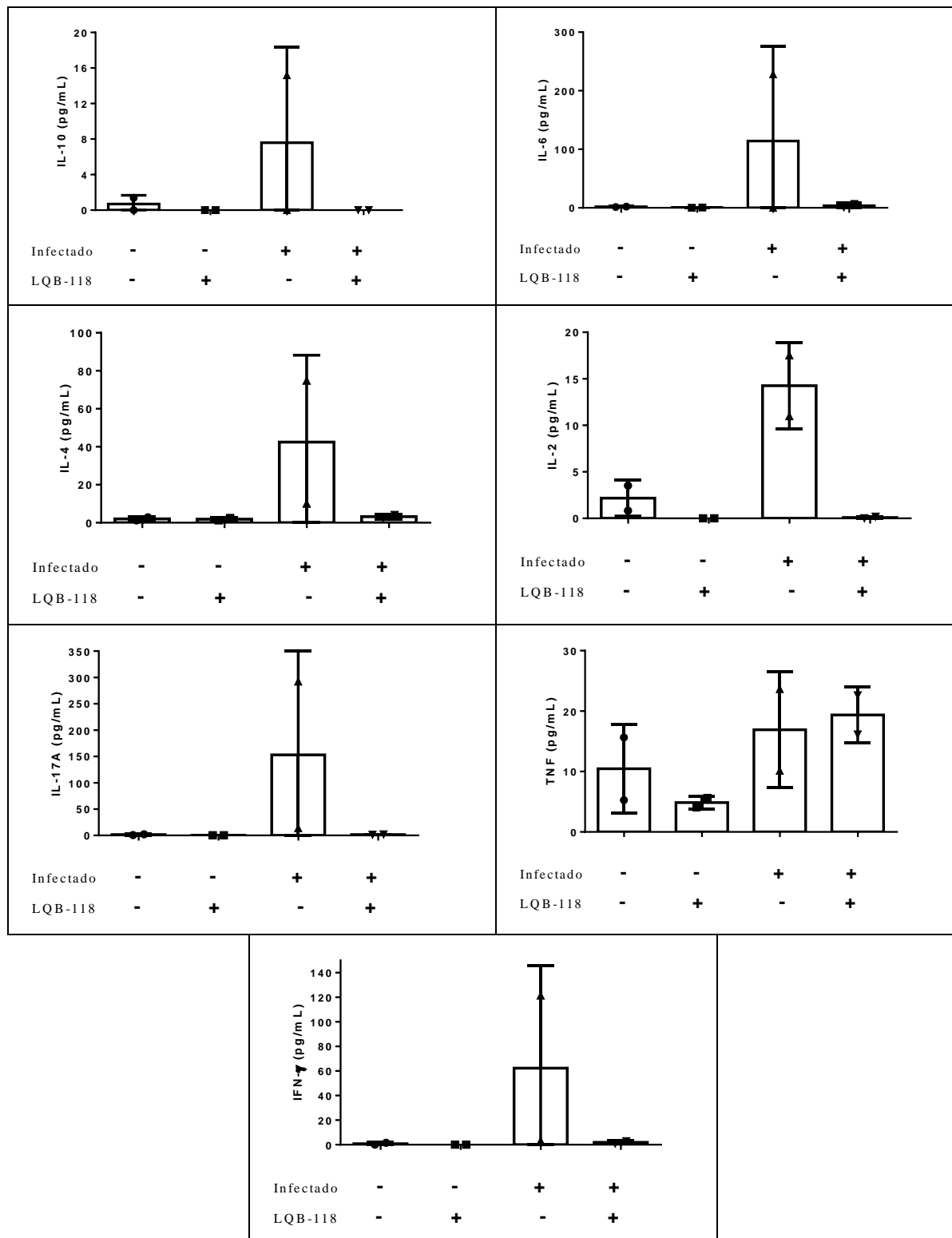


Legenda: Camundongos foram infectados com 100 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*, a avaliação da sobrevivência foi realizada por observação diária dos animais até o 45º dpi. Os grupos foram divididos no 31º dpi e iniciou-se o tratamento que durou até o 45º dpi. Os gráficos representam a percentagem acumulativa dos animais vivos. (n= 33)

3.3.2.3.6 Dosagem de citocinas

O perfil de citocinas do soro de animais foi analisado ao final do experimento. Os resultados preliminares mostraram que os animais infectados não tratados apresentaram aumento de todas citocinas testadas, com exceção do TNF, em comparação aos animais não infectados. Por outro lado, os animais infectados tratados com a LQB-118 apresentaram um perfil de citocina semelhante ao animais controles não infectados (Figura 35).

Figura 35 - Dosagem de citocinas no soro de camundongos *Swiss Webster* no início da fase crônica infectados com *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Camundongos foram infectados ou não com 100 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados ao fim de 46^o dpi, e o soro coletado. A dosagem de citocina foi realizada pelo método CBA. (A) IL-10. (B) IL-6. (C) IL-4. (D) IL-2. (E) IL-17A. (F) TNF. (G) IFN- γ . Teste T (Mann-Whitney test). Controle: Animais não infecção e sem tratamento. (n=8)

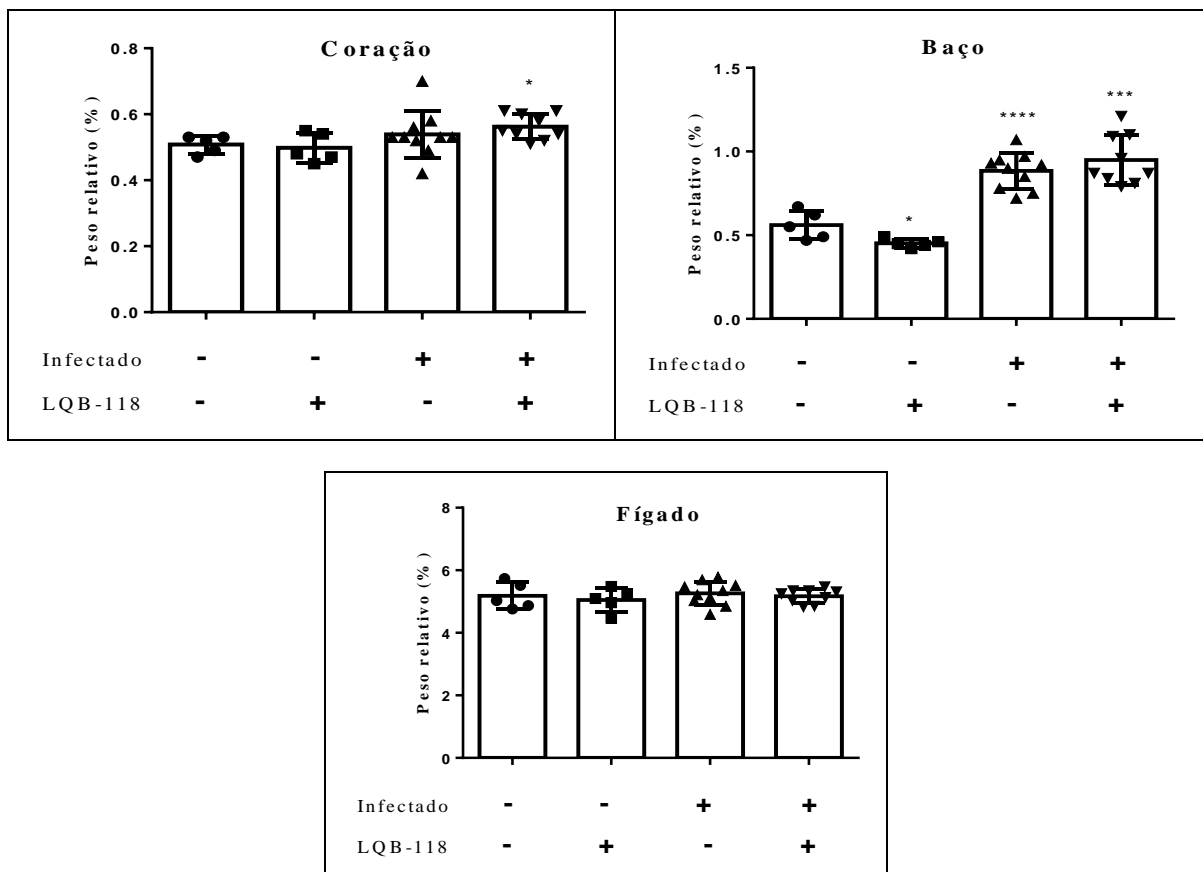
3.3.2.3.7 Pesagem dos órgãos

Ao final do experimento (46 dpi), os animais foram eutanasiados, e os órgãos foram pesados individualmente. O peso relativo foi calculado considerando o peso corporal de cada animal. Os animais infectados, tratados ou não com LQB-118, apresentaram aumento do peso do baço e do coração, enquanto o fígado exibiu peso semelhante ao controle não infectado (Figura 36).

No baço houve um aumento de 57,1% ($p < 0,0007$) e 69,6% ($p < 0,003$) nos animais infectados e infectados tratados com LQB-118, respectivamente, em comparação aos animais não infectados. Entre os animais não infectados, foi observado uma diminuição no peso do baço de 19,7% ($p < 0,02$) dos animais tratados com comparação aos animais sem tratamento.

No coração houve um aumento de 12% ($p < 0,02$) nos animais com infecção e tratados com LQB-118 em comparação aos animais não infectados.

Figura 36 - Peso relativo do coração, baço e fígado de camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi*

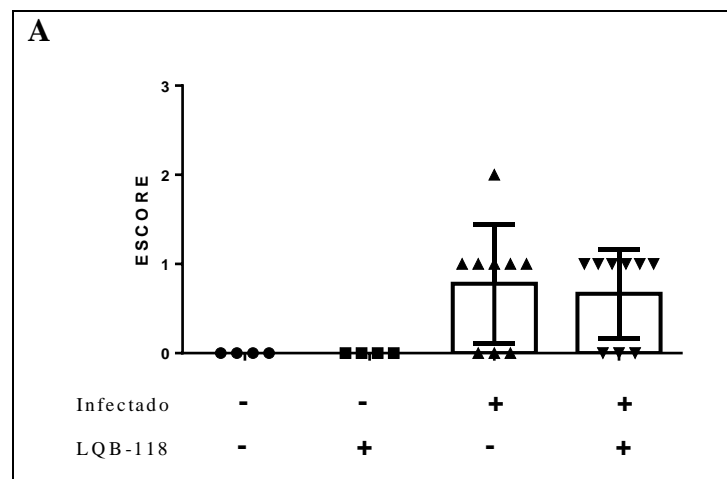


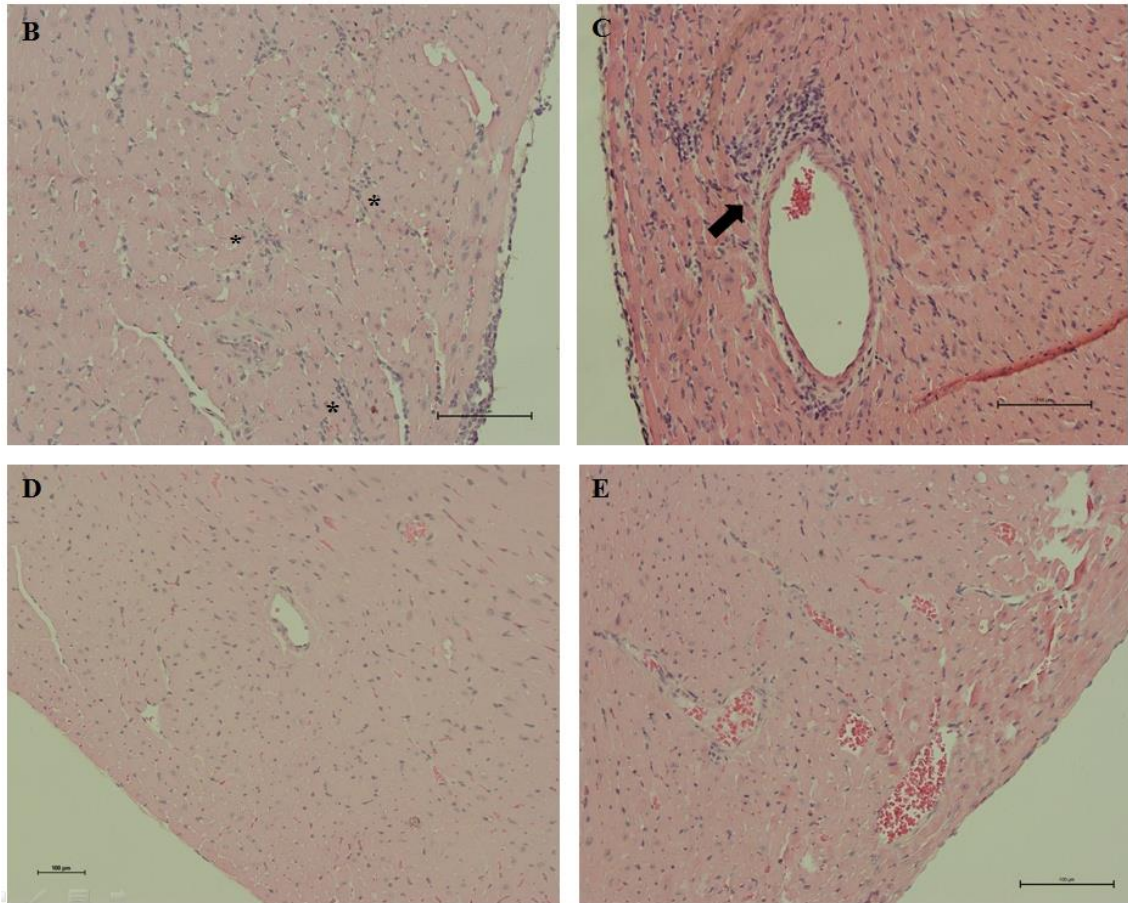
Legenda: Camundongos *Swiss Webster* foram infectados ou não com 100 tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados ao fim de 46º dpi, pesados e seus órgãos retirados e pesados em uma balança de precisão. O peso relativo dos órgãos foi calculado considerando o peso corporal de cada animal. *** $p < 0,0007$; ** $p < 0,003$; * $P < 0,02$. Teste T (Mann-Whitney test). Controle: Animais sem infecção e sem tratamento. (n=29)

3.3.2.3.8 Avaliação histopatológica do coração

A avaliação por escore semiquantitativo (Figura 37A) do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco não mostrou diferença significativa entre os grupos infectados. Porém, os animais tratados com a LQB-118 apresentaram infiltrado inflamatório pontual e perivascular, diferente dos animais não tratados, que apresentaram infiltrado inflamatório difuso e perivascular (Figura 37B).

Figura 37 - Avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório no coração de camundongos *Swiss Webster* tratados com LQB-118

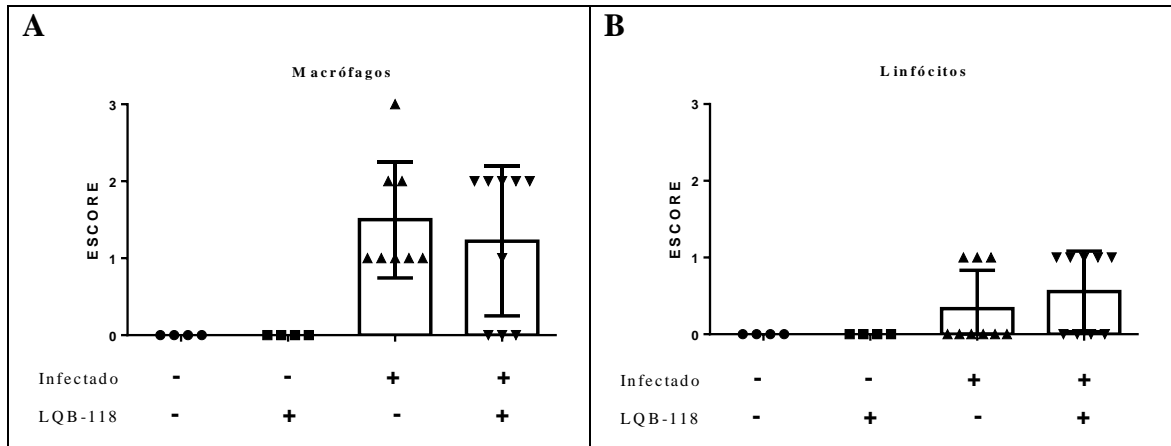




Legenda: Camundongos *Swiss Webster* fêmeas (n= 19) foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (100 parasitos/animal), tratados ou não por 15 dias com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia a partir do 31º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (46º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). (A) Análise escore semiquantitativo; (B) Animais infectados não tratados; (C) Animais infectados tratados com LQB-118; (D) Animais não infectados e não tratados com LQB-118; (E) Animais não infectados e tratados com LQB-118. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Teste t (Mann-Whitney test). Controle: Animais sem infecção e sem tratamento. Asterisco: infiltrado inflamatório difuso; Seta: infiltrado inflamatório perivascular. Aumento: 200x.. (n=29)

Em relação aos componentes celulares do infiltrado inflamatório o perfil foi semelhante entre os grupos infectados. Em ambos os grupos, o infiltrado inflamatório era composto por macrófagos e linfócitos, sem diferença significativa entre os grupos (Figura 38).

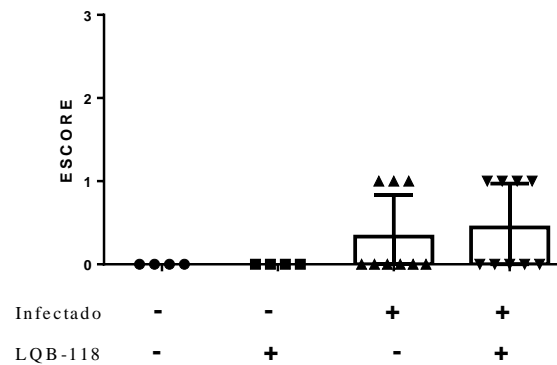
Figura 38 - Avaliação semiquantitativa dos componentes celulares do infiltrado inflamatório no coração de camundongos *Swiss Webster* tratados com LQB-118



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (n= 19) fêmeas foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (100 parasitos/animal), tratados ou não por 15 dias com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia a partir do 31º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (46º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore=0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Teste T (Mann-Whitney test). Controle: Animais sem infecção e sem tratamento. (n=29)

A avaliação semiquantitativa da degeneração de miócitos não indicou diferença entre os grupos infectados, os grupos não infectados não foi observada degeneração de miócitos (Figura 39).

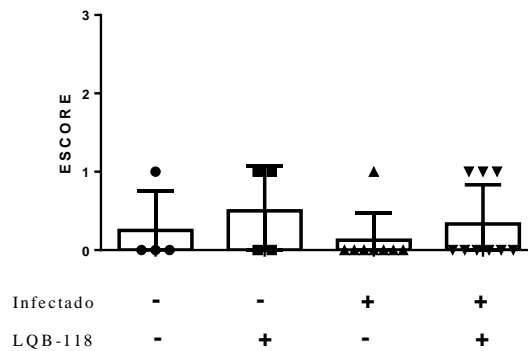
Figura 39 - Avaliação semiquantitativa da degeneração de miócitos no coração de camundongos *Swiss Webster* tratados com LQB-118



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (n= 19) fêmeas foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (100 parasitos/animal), tratados ou não por 15 dias com LQB118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia a partir do 31º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (46º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Teste T (Mann-Whitney test). Controle: Animais sem infecção e sem tratamento. (n=29)

Não foi observada diferença entre os grupos quando foi avaliada a congestão cardíaca (Figura 40). A presença de parasito no tecido cardíaco foi rara, sendo observado em 2 animais tratados e em apenas 1 animal não tratados. Além disso, não foi observada fibrose em nenhum dos grupos.

Figura 40 - Avaliação semiquantitativa da congestão cardíaca no coração de camundongos *Swiss Webster* tratados com LQB-118

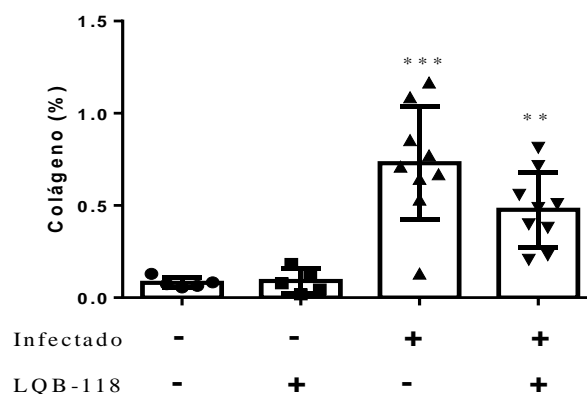


Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (n= 19) fêmeas foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (100 parasitos/animal), tratados ou não por 15 dias com LQB118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia a partir do 31º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (46º dpi) e os cortes do coração foram corados (HE). Análise escore semiquantitativo. Critérios de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico: não observado (escore= 0), pouco observado (escore =1), moderadamente observado (escore= 2) e intensamente observado (escore= 3). Teste T (Mann-Whitney test). Controle: Animais sem infecção e sem tratamento. (n=29)

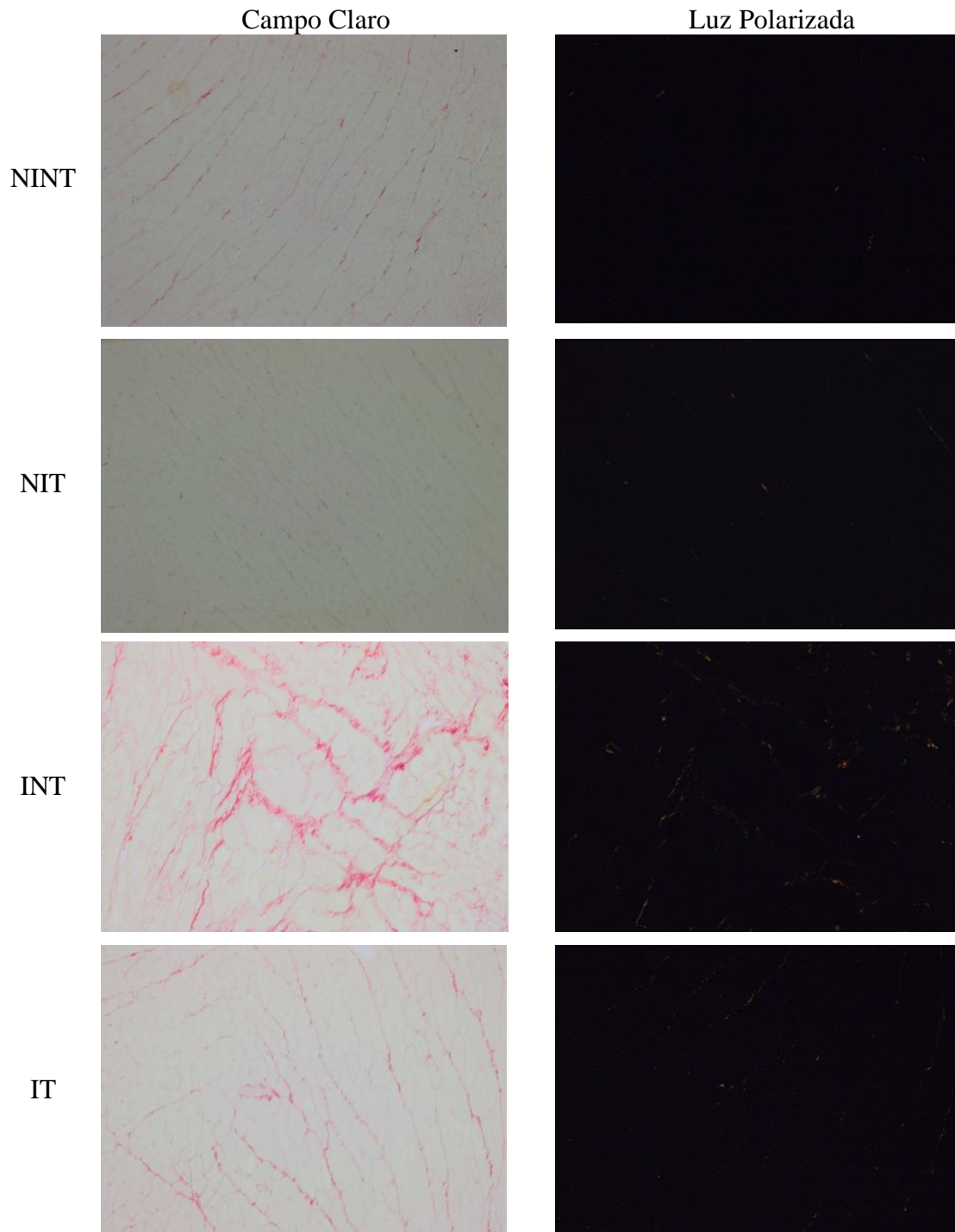
Na análise histopatológica do tecido cardíaco corado com o corante Picrosirius para a quantificação do colágeno, foi observado um aumento de 800% ($p<0,0003$) e 488,8% ($p<0,003$) de depósitos de colágeno nos animais infectados e infectados tratados, respectivamente, em relação aos animais não infectados. Entre os grupos de animais infectados, os animais tratados com a LQB-118 apresentaram redução de 34,6% do percentual de depósito de colágeno em relação ao grupo não tratados (Figura 41).

Figura 41 - Avaliação do percentual de colágeno no coração de camundongos *Swiss Webster* fêmeas infectados com *Trypanosoma cruzi* tratados com LQB-118

A



B



Legenda: Camundongos *Swiss Webster* (n= 19) fêmeas foram infectados com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (100 parasitos/animal), tratados ou não por 15 dias com LQB-118 (20mg/Kg) duas vezes ao dia a partir do 31º dia pós-infecção (dpi). Os animais foram eutanasiados um dia após o fim do tratamento (46º dpi) e os cortes do coração foram corados (Picrosirius). A análise do percentual do colágeno foi realizada através do programa ImagePro, por meio da polarização da luz de lâminas coradas. A) Percentual da quantificação de colágeno. B) Fotomicrografia do colágeno. NINT: animais não infectados e não tratados; NIT: animais não infectados e tratados; INT: animais infectados e não tratados; IT: animais infectados e tratados. **p<0,003; ***p<0,0003. One Way ANOVA (pós-teste Newman-Keuls). Controle: animais não infectados e não tratados. Aumento: 400x (n=29)

Fonte: A autora, 2020

4 DISCUSSÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é endêmica em todos os países da América Central e do Sul, bem como o México (STEVERDING, 2014). Apesar de sua relevância, desde a sua descoberta em 1909 e, portanto, há mais de 110 anos, o tratamento se restringe a dois medicamentos, Benznidazol e Nifurtimox. Esses medicamentos são utilizados principalmente para o tratamento de casos agudos da doença de Chagas, e são considerados menos eficientes na fase crônica (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; STEVERDING, 2014; PÉREZ-MOLINA et al., 2015). Além da eficácia limitada, os medicamentos apresentam alta toxicidade, tais como reações de hipersensibilidade na pele e diversos efeitos gastrointestinais, além de perda de peso, dores de cabeça e mialgia (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; PÉREZ-MOLINA et al., 2015).

Recentemente, alguns estudos têm sido conduzidos para reavaliar o tratamento na fase crônica da infecção usando o Benznidazol em associação com o posaconazol ou fosravuconazol e o tratamento com o fexinidazol (MOLINA et al., 2014; MORILLO et al., 2015, 2017; FRAGATA-FILHO et al., 2016; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019, 2020). Porém, nenhum desses estudos apresentam um resultado satisfatório. Sendo assim, a pesquisa de novos fármacos é necessária visando uma maior eficácia, sobretudo para fase crônica da infecção.

Com o objetivo de colaborar para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, nosso grupo de colaboradores sintetizou a pterocarpanoquinona LQB-118, uma molécula híbrida constituída de uma naftoquinona (lapachol) e um pterocarpano (isoflavonóide). Estudos anteriores mostraram a atividade antitumoral e antiparasitária da LQB-118. A molécula induz apoptose em vários tipos de linhagens leucêmicas, tais como a linhagem de leucemia mielóide crônica (CML), de leucemia linfoblástica aguda (MAIA et al., 2011; DE SÁ BACELAR et al., 2013) leucemia mielóide aguda (AML) (REIS et al., 2013), linhagens celulares tumorais (BUARQUE et al., 2011) e em células de câncer de próstata (MARTINO et al., 2014). Os efeitos antiparasitários foram mostrados contra *Toxoplasma gondii* (PORTES et al., 2012), *Leishmania amazonensis* *in vitro* (RIBEIRO et al., 2013) e *in vivo* (CUNHA-JUNIOR et al., 2011). Nosso grupo mostrou a ação da LQB-118 *in vitro* e *in vivo* em *L. braziliensis* (COSTA et al., 2014). Além dos modelos de leishmaniose cutânea, a LQB-118 apresentou atividade em modelo de leishmaniose visceral, reduzindo a carga parasitária no fígado e baço de animais infectados

com *L. infantum* (CUNHA-JÚNIOR et al., 2016). A indução de morte celular promovida pela LQB-118 em *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi associada com aumento da produção de ROS, redução de ATP e fragmentação de DNA do parasito compatíveis com apoptose (RIBEIRO et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Uma vez que os tripanosomatídeos compartilham algumas semelhanças metabólicas entre si, nosso grupo iniciou estudos da ação da LQB-118 sobre o *T. cruzi*. Resultados iniciais *in vitro*, indicaram atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (clone Dm28) ((AZEVEDO, 2013) dados não publicados) e *in vivo*, o tratamento pela via oral foi capaz de diminuir a parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* (cepa Y) e manter os níveis de creatina quinase normais ((BRITO, 2016) dados não publicados). A avaliação dos níveis de creatina quinase é importante para diagnosticar danos no tecido muscular, já que ela somente é liberada na corrente sanguínea em casos de lesão deste tecido (SCHNEIDER et al., 1995). Esses dados sugerem que animais tratados com a LQB-118 apresentam menor dano muscular do que animais não tratados.

No presente estudo exploramos a atividade da LQB-118 sobre a cepa Y de *T. cruzi*, sobretudo seu potencial terapêutico na infecção crônica. A cepa Y do *T. cruzi* é virulenta para camundongos (ARAÚJO-JORGE, 2000), com tropismo por fibras musculares cardíacas, podendo ainda afetar o fígado e o baço, órgãos também acometidos durante a fase aguda da doença de Chagas (SOUZA; ALENCAR, 1984).

In vitro a LQB-118 demonstrou atividade inibitória sobre as três formas evolutivas do parasito. Em epimastigotas a inibição da proliferação ($IC_{50} = 2,04\mu M \pm 0,07$ em 72h e $1,82\mu M \pm 0,17$ em 96 horas) (Figura 10A) foi acompanhada de mudanças morfológicas. Observamos que em 96h de tratamento os parasitos apresentaram encolhimento e arredondamento do corpo celular, principalmente nas concentrações de $2,5\mu M$ e $5\mu M$ (Figura 10B). Em tripomastigotas sanguíneos, o tratamento por 24h com a LQB-118 *in vitro*, induziu diminuição da motilidade de modo dose-dependente ($IC_{50} = 16,9 \mu M \pm 1,6$ em 24h) (Figura 11) e com mudanças morfológicas evidentes nas concentrações mais altas (20 e $40\mu M$) (Figura 12). Em amastigotas intracelulares a LQB-118 reduziu de modo dose-dependente o índice de infecção ($IC_{50} = 3,96\mu M \pm 1,06$ em 48 horas) (Figura 13). O encolhimento celular foi uma alteração morfológica recorrente observada em epimastigotas e em tripomastigotas tratados com a LQB-118. Elmore (2007) indica que no processo inicial de apoptose pode-se observar o encolhimento celular e a picnose (condensação da cromatina) por microscopia de luz. Diversos trabalhos indicam que a LQB-118 é capaz de induzir apoptose em células tumorais (BUARQUE et al., 2011; MAIA et al., 2011; REIS et al., 2013; MARTINO et al.,

2014; MORAES et al., 2014) e em *Leishmania* sp (RIBEIRO et al., 2013; COSTA et al., 2014). Em um estudo preliminar, o tratamento de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* do clone Dm28c com a LQB-118 induziu marcação com TUNEL, indicando a fragmentação do DNA do parasito ((AZEVEDO, 2013) dados não publicados). Portanto, é possível que a LQB-118 também induza morte celular por apoptose no *T. cruzi* da cepa Y, porém são necessário a realizações de outros métodos que comprovem a indução de apoptose, como fragmentação de DNA e marcação positiva para anexina V. Além da LQB-118, outras moléculas, como derivados de β -lapachona e de tiazóis, induziram apoptose em *T. cruzi*, sendo observado núcleo picnótico, fragmentação de DNA e positivos para anexina V (ANJOS et al., 2016; SILVA et al., 2017)

Comparando os efeitos da LQB-118 com a cepa Y e os obtidos com o clone Dm28c por Azevedo (2013), os valores de IC_{50} são um pouco diferentes. Para o clone Dm28cC, em amastigotas a IC_{50} foi estimada em $4,2\mu M$ (72 horas) e em tripomastigotas metacíclicos foi $38,1\mu M$ (48 horas) ((AZEVEDO, 2013) dados não publicados). No presente estudo com a cepa Y, obtivemos $3,96\mu M$ para amastigotas (48 horas) e $16,9\mu M$ para tripomastigotas sanguíneos (24 horas). Esses resultados podem indicar que a cepa Y é relativamente mais sensível a LQB-118 em comparação com o clone Dm28c, uma vez que o tempo de tratamento foi menor para cepa Y. Bahia e colaboradores (2002) demonstraram que os tripomastigotas metacíclicos possuem algumas características biológicas e bioquímicas não compartilhada com os tripomastigotas sanguíneos (BAHIA et al., 2002), tais como glicoproteínas em sua superfície que interagem com células de mamíferos (CONTRERAS et al., 2002). Os amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (cepaY), também se mostraram mais sensíveis ao tratamento com a LQB-118 em comparação a espécie *L. braziliensis* no qual a IC_{50} foi estimado em $7,2\mu M$ no tempo de 48h (COSTA et al., 2014).

Nos estudos de citotoxicidade para a célula hospedeira (macrófagos de camundongo *Swiss Webster*), a LQB-118 exibiu toxicidade significativa a partir da concentração de $40\mu M$, com CC_{50} estimada em $33,53\mu M \pm 2,37$ (Figura 14) e o índice de seletividade foi 8,46, indicando que LQB-118 é 8 vezes mais tóxica para o *T. cruzi* do que para a célula de mamífero. Em macrófagos murinos da linhagem J774 tratados com LQB-118 por 72h, foi obtido uma CC_{50} de $18,5\mu M$ (BUARQUE et al., 2011), resultado similar ao encontrado em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c, também tratados por 72h, no qual a CC_{50} foi estimada em $18,46\mu M$ (CUNHA-JUNIOR et al., 2011). A diferença de CC_{50} do nosso estudo para os da literatura, pode ter se dado devido ao tempo de tratamentos das células de

mamíferos, que no nosso trabalho foi menor (48h) que os demais e também as diferenças entre as origens das células.

Após os resultados promissores obtidos mostrados *in vitro*, testamos a molécula LQB-118 em camundongo infectados com *T. cruzi*. O modelo experimental escolhido neste trabalho foi o camundongo albino *Swiss Webster* (camundongo não isogênico), pela sua suscetibilidade a diferentes cepas de *T. cruzi*, além de serem modelos para o estudo de quimioterapia experimental para doença de Chagas (ARAÚJO-JORGE, 2000; CASTRO et al., 2000; ROMANHA et al., 2010).

Inicialmente investigamos o efeito da LQB-118 na fase aguda da infecção usando 40mg/Kg/dia por via oral. O pico da parasitemia ocorreu no 8º dpi, sendo maior no grupo tratado em comparação com o grupo não tratado, porém sem diferença estatística. No 11º e no 12º dpi a redução da parasitemia do grupo tratado com a LQB-118 foi significativa, sendo 49,47% e 41,14% menor, respectivamente, em relação ao grupo não tratado. No 15º dpi, apesar de não ser estatisticamente significativa, a redução da parasitemia foi de 53,3%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 15). Estes dados se tornam relevantes uma vez que a literatura vem relacionando a redução da parasitemia com a diminuição de focos inflamatórios. Oda e colaboradores (2017) observaram que camundongos *Swiss Webster* infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com aspirina (ASA) apresentaram diminuição da parasitemia e conseqüentemente da intensidade dos focos inflamatórios na parede do colón, considerando que a parasitemia está diretamente associada ao processo inflamatório nos tecidos. Calda e colaboradores (2019) também observaram a correlação entre a parasitemia e o processo inflamatório, no qual o tratamento com Benznidazol de cães infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* resultava na eliminação dos parasitos no início da infecção havendo prevenção da fibrose e dos danos cardíacos. Da mesma forma, como mostrado no nosso estudo, a diminuição da parasitemia dos grupos tratados ainda no início da infecção, levou a uma diminuição do parasitismo tecidual e maior proteção do tecido cardíaco (Figura 16).

O miocárdio é um dos tecidos mais afetados durante a infecção por *T. cruzi* (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE; SILVA-DOS-SANTOS; PÉREZ, 2015; BONNEY et al., 2019), na qual os pacientes apresentam hipertrofia miocárdica (HIGUCHI et al., 2003), ocorre um processo inflamatório, com fenômenos vasculares, exsudativos e degenerativo necrótico (LOPES; CHAPADEIRO, 1997). Experimentalmente, em diversos modelos, o quadro se assemelha, com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear composto por macrófagos, linfócitos e seus derivados afetando tanto o pericárdio como o miocárdio,

resultando em miocardite com necrose miocitolítica e degeneração das miofibras, fibrose intersticial e fibras cardíacas contendo ninhos de amastigotas (FIGUEIREDO; ROSSI; SANTOS, 1985; CHAPADEIRO et al., 1988; LOPES; CHAPADEIRO, 1997; BARRETO-DE-ALBUQUERQUE; SILVA-DOS-SANTOS; PÉREZ, 2015)

Na figura 16A que os animais tratados na fase aguda com a LQB-118 apresentaram uma tendência de redução do número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, mas sem significância estatística (Figura 16A). O mesmo perfil foi observado pela análise semiquantitativa por escore (Figura 16B). É sabido que a lesão de órgãos e tecidos durante infecção aguda com *T. cruzi* é correlacionada com presença do parasita e a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A avaliação quantitativa através da estereologia (Figura 17A) e escore semiquantitativo (Figura 17B) do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco não mostrou diferença entre os grupos. Porém, os animais tratados com a LQB-118 apresentaram infiltrado inflamatórios pontuais, diferente dos animais não tratados, que apresentaram infiltrado inflamatórios mais extensos. Em relação aos componentes celulares do infiltrado inflamatório o perfil foi semelhante entre os grupos, com predominância de macrófagos e linfócitos (Figura 18). Avaliamos também a degradação de miócitos, que foi ligeiramente maior nos animais tratados em comparação com o grupo controle, porém não houve diferença estatística (Figura 19). Classicamente, no coração, observa-se inflamação do miocárdio caracterizada por vacuolização, miocitólise e degeneração miofibrilar e uma intensa infiltração de células mononucleares (inicialmente composta de macrófagos e neutrófilos e posteriormente, com inclusão de linfócitos, células plasmáticas, eosinófilos e mastócitos), causando a cardiomiopatia chagásica (BONNEY et al., 2019). Essas características foram semelhantes com as encontradas no nosso estudo. Além disso a inflamação difusa observada no grupo não tratado pode indicar um maior dano no tecido cardíaco desses animais, quando comparado ao grupo tratado no qual foi observada inflamação pontual. Apesar dos resultados indicarem um leve aumento da degradação dos miócitos (estatisticamente não significativo) no grupo tratado, estudos preliminares do nosso grupo, mostraram que o tratamento com a LQB-118 na fase aguda por 12 dias reduziu os níveis séricos de creatina quinase ((BRITO, 2016) dados não publicados), uma proteína relacionada a destruição de fibra musculares (SCHNEIDER et al., 1995). Em conjunto nossos dados sugerem que durante a fase aguda, a LQB-118 parece conferir proteção ao tecido cardíaco de animais tratados uma vez que diminui os ninhos de amastigota e não resulta em degradação significativa dos miócitos.

A fibrose cardíaca é caracterizada pelo desequilíbrio na produção de matriz extracelular (composta de colágeno e elastina) e degradação, levando ao aumento da rigidez cardíaca e dificultado as contrações do coração (MA et al., 2018) e na histopatologia cardíaca da doença de Chagas observa-se uma combinação de fibrose intersticial, hipertrofia miocítica e alterações intersticiais (VIEIRA et al., 2019). No nosso estudo, os animais tratados com a LQB-118 apresentaram redução da quantidade de colágeno depositado no tecido cardíaco (Figura 20). Esse dado sugere que o tratamento com a LQB-118 pode contribuir diretamente para diminuição da fibrose cardíaca, como também pode resultar em um menor número de parasitos e diminuição do processo inflamatório no tecido. Riça e colaboradores (2016) demonstraram a propriedade anti-inflamatória da LQB-118 em camundongos C57BL/6 com inflamação pulmonar, no qual a LQB-118 reduziu o influxo de neutrófilos modulando assim, negativamente mediadores inflamatórios, como TNF- α .

Visto os resultados positivos do potencial terapêutico da LQB-118 na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, foi realizada a avaliação na fase crônica da infecção. Dada as diferenças já reconhecidas de susceptibilidade entre os gêneros de camundongos *Swiss Webster* para a infecção com o *T. cruzi* (CASTRO; SOUZA, 2000) e a alta virulência apresentada pela cepa Y (RODRIGUEZ et al., 2014), foi necessário realizar uma padronização do modelo para se aproximar da fase crônica da infecção antes de testar o potencial terapêutico da LQB-118. A avaliação do tamanho do inóculo nos dois gêneros mostrou diferenças entre machos e fêmeas durante a avaliação da parasitemia. As fêmeas apresentaram a parasitemia com picos no 10º dpi (inóculo de 500 ou 100 parasitos/animal) e no 11º dpi (inóculo de 40 parasitos/ animal), já os machos apresentaram diferentes picos de parasitemia durante a curso da infecção, como no 10º e 21º dpi (inóculo de 500 parasitos/animal), no 18º dpi (inóculo de 100 parasitos/animal), e no 11º e 21º dpi (inóculo de 40 parasitos/animal) (Figura 21). Além disso, observamos uma alta mortalidade nos machos em comparação as fêmeas (Figura24). Guedes-da-Silva e colaboradores (2015), também observaram diferenças entre machos e fêmeas de camundongos *Swiss Webster* infectados com diferentes inóculos de *T. cruzi* da cepa Y e registraram alta mortalidade em machos, corroborando nossos resultados acerca da maior vulnerabilidade desse gênero diante da infecção. Além disso, outros estudos apontam diferenças entre os gêneros em relação as taxas de mortalidade usando outras linhagens de camundongo (SOUZA et al., 2001; VORRARO et al., 2014). Usando o modelo *Calomyscallosus*, Prado Jr. e colaboradores (1998) demonstraram que a gonadectomia afetou o curso das infecções por *T. cruzi* em fêmeas, levando a altos níveis de parasitemia em comparação aos controles e animais operados por

simulação (realização de uma incisão na cavidade peritoneal sem remoção ovários). A reposição hormonal, promoveu diminuição no número de tripomastigotas no sangue para níveis semelhantes aos observados no controle, indicando que os hormônios sexuais podem influenciar os mecanismos imunológicos naturais e controle da infecção (PRADO JR. et al., 1998).

Diante desses resultados, optamos pelo uso de camundongos *Swiss Webster* fêmeas e o inóculo de 100 parasitos/animal para estabelecer a fase crônica e posteriormente investigar o efeito terapêutico da LQB-118. Com esse protocolo, acompanhamos o curso da infecção nas fêmeas que apresentaram picos de parasitemia no 9º dpi, diminuindo progressivamente até o 30º dpi, quando nenhum animal apresentava parasitos circulantes no sangue (início da fase crônica) (SILVERIO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; FERREIRA et al., 2019).

Óbitos foram registrados somente durante a fase aguda (4/23) (Tabela 4). Em relação a avaliação física e comportamental, a partir do 15º dpi, os animais infectados apresentaram piloereção (principalmente na região dorsal), postura anormal (encurvada) e pouca locomoção, com perda de peso observada a partir do 18º dpi. Silva e colaboradores (2012) observou que camundongos Balb/c infectados com a cepa Y de *T. cruzi* a partir do 13º dpi apresentaram piloereção, orelhas inclinadas para baixo, postura encurvada, olhos fechados, imobilidade e isolamento social, além desses sinais clínicos, Mazzeti e colaboradores (2018b) observaram sinais de dor como torção e espasmos. Em nosso estudo, observamos que no 25º/28º dpi os animais recuperaram progressivamente a postura e a motilidade.

Após estabelecimento desses parâmetros iniciamos o ensaio para avaliação do potencial terapêutico da LQB-118. As fêmeas de camundongos *Swiss Webster* receberam tratamento com a LQB-118 pela via oral (20 mg/Kg 2x por dia) a partir do 31º dpi durante 15 dias consecutivos. A infecção por si só aumentou o peso relativo do baço de animais não tratados em 57,1% e 69,6% em animais tratados com LQB-118, em comparação com animais não infectados (Figura 36). Em um estudo utilizando 88 protocolos de necropsias completas, o peso do baço nos indivíduos sem insuficiência cardíaca congestiva foi significativamente maior entre os pacientesportadores de doença de Chagas, quando comparados aos não-portadores, indicando que o componente inflamatório na doença de Chagas humana desempenharia papel importante no aumento do peso do baço (PEREIRA et al., 1999).

Em uma avaliação preliminar do perfil de citocinas séricas, observamos que animais infectados não tratados de uma forma geral apresentaram aumento tanto de citocinas pró-inflamatórias (IL-17A, IFN- γ , IL-6, IL-2) quanto anti-inflamatórias (IL-10, IL-4) (Figura 35). Em contrapartida os animais tratados com a LQB-118 apresentaram níveis baixos e perfil de

citocinas semelhante aos animais não infectados (Figura 35). Uma resposta imune do tipo Th1, com produção de citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ e TNF, tem um papel importante para ação tripanossomicida e controle da infecção (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Por outro lado, uma resposta pro-inflamatória excessiva causada no tecido e contribuiu para a patogênese (RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Riça e colaboradores (2016) observaram que o pré-tratamento com a LQB-118 de animais com inflamação pulmonar induzida por LPS, a molécula reduziu a migração de neutrófilos e os níveis de TNF- α . Lima e colaboradores (2020) observaram efeitos semelhantes no pré-tratamento de animais, no qual a LQB-118 inibiu os efeitos induzidos pelo zimosan, com redução de migração de neutrófilos, redução de níveis de IL-1 β e TNF- α , porém sem alteração dos níveis de IL-6, indicando um efeito anti-inflamatório da molécula. Embora sejam necessários mais dados, nossos resultados preliminares mostram que o tratamento com a LQB-118 parece ter induzido de forma geral uma redução das citocinas, indicando uma propriedade anti-inflamatória na molécula na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Na avaliação histopatológica do coração, observamos que em 66,6% dos animais tratados com a LQB-118 o infiltrado inflamatório foi leve. Por outro lado, no grupo não tratado, 11,1% dos animais apresentaram um infiltrado inflamatório moderado (Figura 37). Esse resultado mostra que nos animais não tratados apresentaram relativamente mais infiltrado inflamatório, sugerindo maior inflamação no tecido. Na fase aguda, a maioria dos animais infectados apresentaram o infiltrado inflamatório moderado (Figura 17). Essa diferença na intensidade do infiltrado inflamatório entre as fases aguda e crônica, pode ter ocorrido devido à diferença dos inóculos utilizados, uma vez que na fase aguda utilizamos 10^3 parasitos/animal e na fase crônica foram inoculados 10^2 parasitos/animal. Também houve variação com relação ao tempo de avaliação, já que o progresso da infecção pode variar dependendo da carga parasitária (PINTO et al., 1986; LEMOS et al., 2013; VAZQUEZ et al., 2015). Observamos ainda diferença significativa quanto aos tipos celulares que compõem o infiltrado inflamatório e sua intensidade nas duas fases da doença de Chagas. Enquanto que na fase aguda, se observa a predominância de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Figura 18), na fase crônica, não foram observados neutrófilos infiltrados no tecido analisados (Figura 38). Na fase crônica, na maioria dos animais infectados não tratados não foi observada a presença de linfócitos (75%), já nos animais tratados com a LQB-118, os linfócitos foram pouco observados em 55,6% dos animais. Em 62,5% dos animais infectados e não tratados foram observados poucos macrófagos, já nos animais tratados com a LQB-118, os macrófagos foram observados de forma moderada em 55,6%. Soares e colaboradores (2010) observaram

que o infiltrado inflamatório cardíaco de camundongo cronicamente infectados com a cepa Colombiana *T. cruzi* era composto por macrófagos e linfócitos, porém com um tempo de infecção de 8 meses. A degeneração de miócitos não apresentou diferença significativa entre os grupos de animais infectados na fase crônica da doença de Chagas (Figura 39), porém foi menor do que a ocorrida na fase aguda da infecção (Figura 19).

As diferenças observadas neste estudo entre as fases aguda e crônica da infecção em relação a presença de amastigotas e ao processo inflamatório do tecido cardíaco, pode ser ocasionada não só pelo ciclo que vida do parasito, mas também pela resposta imune do hospedeiro ao inóculo utilizado. Como demonstrado em alguns estudos, a concentração de parasitos no momento da infecção afeta o desenvolvimento da parasitemia e a produção de citocinas (LEMOS et al., 2013; VAZQUEZ et al., 2015) e esse fenômeno pode ser explicado pelo ciclo biológico do parasito, uma vez que a divisão binária do parasito nas células fagocíticas favorece o aparecimento de tripomastigotas no sangue de camundongos inoculados com altas doses e/ou pelo fato da resposta imune do hospedeiro será mais competente em conter a propagação do parasito em animais infectados com doses menores de parasitos (LEMOS et al., 2013).

Na cardiopatia chagásica humana crônica, a fibrose é difusa e mostra um grau variável de deposição de colágeno, além disso são encontrados focos com intensa deposição de colágeno relacionados a degeneração e necrose de cardiomiocitos e infiltrado inflamatório crônico (CALIARI et al., 2002). No nosso estudo, a quantificação do colágeno, indicou que houve um aumento de 800% nos animais infectados não tratados e de 488,8% nos animais infectados e tratados com a LQB-118, em comparação aos animais não infectados. Entre os grupos de animais infectados, os animais tratados com a LQB-118 apresentaram um redução de 34,6% no percentual de deposição de colágeno em relação aos não tratados (Figura 41). A destruição miocárdica e fibrose focal e difusa, que não estão diretamente associadas ao parasitismo, indicam inflamação crônica progressiva, provavelmente correlacionada com mecanismos imunológicos, pois os mesmos achados morfológicos ocorreram em cães infectados cronicamente com *T. cruzi*, porém com a ausência de parasitas ou lesões vasculares (CALIARI et al., 2002). No nosso estudo, a presença de parasitos no tecido cardíaco na fase crônica foi rara, sendo observado em apenas 22% (2/9) dos animais tratados com a LQB-118 e em 10% (1/10) dos animais não tratados. Porém mesmo com a presença de colágeno, não foi observada a formação da fibrose. A fibrose cardíaca é caracterizada pelo acúmulo líquido de matriz extracelular no miocárdio, devido a perda súbita de um grande número cardiomiócitos que desencadeia uma reação inflamatória, levando a substituição de miocárdio

morto com cicatriz a base de colágeno (KONG; CHRISTIA; FRANGOIANNIS, 2014). Portanto, uma possível explicação para ausência de fibrose no nosso estudo seria o fato de que o inóculo utilizado (10^2 parasitos) provocou um leve processo inflamatório e destruição de miócitos que não foi suficiente para geração de fibrose.

Os modelos de infecção crônica são estabelecidos infectando animais com um número pequeno de parasitos ou administrando doses insuficientes de medicamentos para obter a cura durante a fase aguda da infecção, além disso experimentos de teste de fármacos em modelos crônicos são demorados e caros, podendo levar meses para que os camundongos cheguem a um estado de infecção crônica pleno (CHATELAIN; KONAR, 2015). Oda e colaboradores (2017) utilizaram o Benznidazol (100mg/Kg) para diminuir a carga parasitária de camundongos *Swiss Webster* infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e, assim induzir a fase crônica da infecção. Em seus respectivos estudos utilizando a cepa Tulahuen, Bustamante e colaboradores (2007) e Fauro e colaboradores (2013) infectaram camundongos *Swiss Webster* e trataram com Tioridazane e Clomipramine, aos 180 e 90 dias após a infecção, com experimentos durando 350 e 360 dias, respectivamente. Por outro lado, Bahia e colaboradores (2012) utilizando diferentes cepas (Y, CL, VT-10 e Colombiana) infectaram camundongos *Swiss Webstere* iniciaram o tratamento após 120 dpi e as avaliações foram realizadas 180 dias após o tratamento. Os trabalhos utilizando a cepa Y para a fase crônica são escassos, principalmente devido a virulência apresentada em modelos murinos. Em nosso estudo usamos tempos relativamente curtos, iniciamos o tratamento com 31 dias de infecção com duração de 15 dias, totalizando 45 dpi para as análises.

Portanto, um estudo mais prolongado se faz necessário futuramente para uma avaliação mais detalhada do efeito terapêutico da LQB-118 na fase crônica da infecção. Apesar dos resultados importantes apresentados neste estudo, o protocolo utilizado deve ser aprimorado. Além disso, avaliações que não foram possíveis serem realizadas neste estudo, como a análise da função cardíaca e eletrocardiogramas deverão ser incluídos. De modo geral, nossos dados *in vitro* e *in vivo* indicam que a pterocarpanoquinona LQB-118 apresenta atividade tripanossomicida importante e promissora.

CONCLUSÃO

A molécula LQB-118 apresenta atividade inibitória *in vitro* contra formas epimastigotas, tripomastigotas sanguíneas e amastigotas de forma dose dependente, com IC₅₀ estimada em 1,82 µM ± 0,17 (96h), 16,9µM ± 1,6 (24h) e 3,96µM ± 1,06 (48h), respectivamente. O índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀ de amastigota intracelular) foi 8,46, indicando que LQB-118 é 8x mais tóxica para o *T. cruzi* do que para a célula de mamífero. Epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos tratados com LQB-118 apresentaram alterações morfológicas sugestivas de apoptose.

Nos estudos *in vivo*, durante a fase aguda da infecção, a LQB-118 foi capaz de diminuir a parasitemia dos animais infectados. Nas avaliações histopatológicas do tecido cardíaco, a LQB-118 promoveu uma tendência na redução do número de ninhos de amastigotas, não houve diferença significativa no infiltrado inflamatório, porém os animais tratados com a LQB-118 apresentaram infiltrado inflamatórios pontuais, diferente dos animais não tratados, que apresentaram infiltrado inflamatórios mais extensos. Em relação aos componentes celulares do infiltrado inflamatório o perfil foi semelhante entre os grupos (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), mas em relação a degradação de miócitos, os animais tratados apresentaram um ligeiro aumento em comparação com o grupo controle, entretanto sem alteração na quantificação de colágeno.

Nas avaliações do início da fase crônica, o baço foi o órgão que mais aumentou nos animais infectados. Na avaliação histopatológica do coração, o infiltrado inflamatório se apresentou com pouca intensidade e de forma organizada não havendo diferença entre os animais tratados ou não. No entanto, nos animais tratados com a LQB-118 a quantidade de colágeno foi significativamente menor.

A pterocarpanoquinona LQB-118 apresentou resultados promissores tanto *in vitro* quanto *in vivo* na infecção pelo *T. cruzi*. *In vitro*, apresentando efeito tripanossomicida não três formas evolutivas principais do parasito e *in vivo*, apresentando atividade com diminuição da parasitemia na fase aguda e redução da deposição de colágeno no início da fase crônica da infecção.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, G. R., GIRARD, M. C., GÓMEZ, K. A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1-23, 2018.
- ALVES, M. J. M.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*, v. 59, n. 4-5, p. 274-279, 2007.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes 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, 1996.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. June, p. 71-80, 1999.
- ANDREWS, N. W. et al. A *T. cruzi*-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low pH. *Cell*, v. 61, p. 1277-1287, 1990.
- ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion*, v. 13, n. 4, p. 540-550, 2015.
- ANJOS, D. O. dos et al. Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 6, n. 3, p. 207-219, dez. 2016.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. Modelos animais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos: Camundongo. In: ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE (Ed.). *Doença de Chagas Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, 2000. p. 134-140.
- ARAUJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 0102-695X, p. 57-59, 2002.
- ARAUJO, P. F. et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 112, n. 6, p. 437-446, 2017. Disponível em:
- AZEVEDO, B. F. de. Atividade in vitro da pterocarpanoquinona LQB 118 sobre o *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação, 2013].
- BAHIA, M. T. et al. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, p. 339-345, 2002.
- BAHIA, M. T. et al. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 11, 2012.

BARBOSA, R. L. et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai (*Euterpe oleraceane* Martius) pulp following mild heat treatment. *Journal of Food Protection*, v. 79, p. 1807–1812, 2016.

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J.; SILVA-DOS-SANTOS, D.; PÉREZ, A. R. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice : New Disease Form from an Old Infection ? *PLOS Neglected Tropical Diseases*, p. 1–21, 2015.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin*, v. 104, n. 1, p. 175–196, 1 dez. 2012.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, v. 156, p. 1–16, abr. 2016.

BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, p. 655–681, 2011.

BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 130, p. 408–418, jan. 2019.

BONA, E. de et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1–8, 6 ago. 2018.

BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 14, n. 1, p. 419–445, 24 jan. 2019.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 389–396, 1962.

BRITO, A. C. de S. Atividade *in vitro* e *in vivo* da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação, 2016].

BUARQUE, C. D. et al. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives : Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 22, p. 6885–6891, 2011.

BUARQUE, C. D. et al. 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 78, p. 190–197, maio 2014.

BUSTAMANTE, J. M. et al. 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.

CALDAS, I. S. et al. Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Acta Tropica*, v. 189, p. 30–38, jan. 2019.

- CALIARI, M. V. et al. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 44, n. 5, p. 273–278, 2002.
- CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 110, n. 3, p. 363, 2015. Disponível em:
- CAROD-ARTAL, F. J. Infectious diseases causing autonomic dysfunction. *Clinical Autonomic Research*, v. 28, n. 1, p. 67–81, 2018.
- CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. *The Lancet Neurology*, v. 9, n. 5, p. 533–542, 2010.
- CASTRO, S. L. de et al. Avaliação de Parâmetros Parasitológicos e de Mortalidade. In: ARAÚJO-JORGE, T. C.; DE CASTRO, S. L. (Ed.). *Doença de Chagas Manual para experimentação animal*. p. 219–236, 2000.
- CASTRO, S. L. de; SOUZA, E. M. de. Hormônios Sexuais. In: ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE (Ed.). *Doença de Chagas Manual para experimentação animal*. p. 90–92, 2000.
- CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human and Experimental Toxicology*, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159–218, 1909.
- CHAIN, CY et al. *Trypanosoma cruzi* virulence factors for the diagnosis of Chagas' disease. *ACS Infect. Dis*, v.5, p. 1813–1819, 2019.
- CHAPADEIRO, E. et al. Lesões cardíacas em ratos Wistar inoculados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 21, n. 3, p. 95–103, 1988.
- CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development : a review. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 9, p. 4807–4823, 2015.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo. *Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.
- CLARK, N. M.; GRIM, S. A.; LYNCH, J. P. Posaconazole: Use in the Prophylaxis and Treatment of Fungal Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 36, n. 5, p. 767–785, 2015.
- CONTRERAS, V. T. et al. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 8, p. 1213–1220, 2002.

- CORASSA, R. B. et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Perspectives in Public Health*, v. 137, n. 5, p. 289–295, 10 set. 2017.
- CORDEIRO, F. D. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 Can be a useful tool for diagnosis and prognosis of Human Chagas' Disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 1, p. 112–118, 2001.
- COSTA, L. et al. Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109672, 23 out. 2014.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2 dez. 2015.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.
- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.
- CUNHA-JUNIOR, E. F. da et al. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 7, p. 1555–1559, 1 jul. 2011.
- CUNHA-JÚNIOR, E. F. et al. Preclinical Studies Evaluating Subacute Toxicity and Therapeutic Efficacy of LQB-118 in Experimental Visceral Leishmaniasis. *American Society for Microbiology*, v. 60, n. 6, p. 3794–3801, 2016.
- CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1–11, 2014.
- D'AVILA-LEVY, C. M. et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 8, p. 956–965, 2015.
- DE SÁ BACELAR, T. et al. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. *Anti-Cancer Drugs*, v. 24, n. 1, p. 73–83, 2013.
- DEEKS, E. D. Fexinidazole: First Global Approval. *Drugs*, v. 79, n. 2, p. 215–220, 2019.
- DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas , 2015 *. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 25, p. 7–86, 2016.
- DIAS, J. C. P.; BORGES-PEREIRA, J.; MACEDO, V. de O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. (Ed.). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2. ed. Rio de Janeiro:

Guanabara Koogan. p. 606–641, 2013.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. História sobre a Doença de Chagas no Brasil, v. 44 (Suppl, p. 68–72, 2011.

DOCAMPO, R. Sensitivity of Parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem. Biol. Interactions, v. 73, p. 1–27, 1990.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES. Novo Tratamento para Crianças com a Doença de Chagas Aprovado pela ANVISA – DNDi. Disponível em: <<https://www.dndi.org/2011/media-centre/langues-press-releases/benzonidazolped/>>. Acesso em: 3 jun. 2018.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. New Benznidazole regimens. Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/new-benz-regimens/>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Fexinidazole for Chagas. Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole-for-chagas/>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

DUTRA, P. M. L. et al. Tripanossomíase Americana. In: ALVES, P. C. DE C.; POIAN, A. T. DA; ABRAHÃO, A. (Ed.). Bases Moleculares em Clínica Médica. Atheneu ed. [s.l.: s.n.]p. 203–223, 2010.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. Trends in Parasitology, v. 21, n. 12, p. 581–587, 2005.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol., v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology, v. 126, n. 3, p. 283–291, 2010.

F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD. Improving access: overcoming barriers. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.roche.com/dam/jcr:a9c0006a-fed9-4864-a8c9-d8ffec6ca508/en/access_to_healthcare.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2019.

FAIÕES, S. et al. Second-generation pterocarpanquinones : synthesis and antileishmanial activity. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, p. 1–11, 2018.

FAURO, R. et al. Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. Parasitology, v. 140, n. 7, p. 917–927, 2013.

FELIZARDO, A. A. et al. Impact of *Trypanosoma cruzi* infection on nitric oxide synthase and arginase expression and activity in young and elderly mice. Free Radical Biology and Medicine, v. 129, p. 227-236, 2018.

FERREIRA, R. R. et al. TGF- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 7, p. e0007602, 31 jul. 2019.

FIGUEIREDO, F.; ROSSI, M. A.; SANTOS, R. R. Evolução da cardiopatia experimentalmente induzida em coelhos infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 18, n. 3, p. 133–141, 1985.

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

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. *Medicina Clínica (English Edition)*, v. 148, n. 3, p. 125–131, 2017.

FRAGATA-FILHO, A. A. et al. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazol in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2016.

GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in Human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.

GUEDES-DA-SILVA, F. H. et al. Different therapeutic outcomes of Benznidazole and VNI treatments in different genders in mouse experimental models of *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 12, p. 7564–7570, 2015.

GUNTER, S. M. et al. Likely Autochthonous Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Humans, South Central Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 3, p. 494–497, mar. 2017.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 115–123, 2011.

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

HOWARD, E. J. et al. 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, jan. 2014.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. *Arkivoc*, v. 2007, n. ii, p. 145–171, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Métodos de Estudo em Histologia. In: *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 1–20.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus

polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal*, v. 11, p. 447–455, 1971.

KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 287, 8 dez. 2017.

KENNEDY, P. G. E. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Journal of Neurology*, v. 266, p. 2334–2337, 2019.

KONG, P.; CHRISTIA, P.; FRANGOIANNIS, N. G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, n. 4, p. 549–574, 7 fev. 2014.

KRATZ, J. M. et al. Clinical Pharmacology Clinical and pharmacological profile of Benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.

LANA, M. de; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (Ed.). *Parasitologia Humana*. 12. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 89–101.

LEE, J. H. et al. LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 6, p. 2057–2063, 2006.

LEMOS, J. R. D. et al. Influence of Parasite Load on Renal Function in Mice Acutely Infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in Public Health*, v. 7, n. July, p. 1–13, 2019.

LIMA, E. A. et al. The pterocarpanquinone LQB 118 inhibits inflammation triggered by zymosan *in vivo* and *in vitro*. *International Immunopharmacology*, v.83, p. 1-9, 2020.

LIMA, L. et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica*, v. 151, p. 166–177, 2015.

LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*, v. 4, n. 1, p. 30–59, 2010.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*, p. 486, 1997.

MA, Z. et al. Cardiac fibrosis : new insights into the pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 12, p. 1645–1657, 2018.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 4, n. 5, p. 1–16, 2002.

MACHADO, F. S. et al. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. *Cardiology in Review*, v. 20, n. 2, p. 1, jan. 2012.

- MAIA, R. C. et al. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Investigational New Drugs*, v. 29, n. 6, p. 1143–1155, 2011.
- MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease. *Clinical Cardiology*, v. 38, n. 9, p. 565–569, 2015a.
- MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. *The American Journal of Medicine*, v. 128, n. 11, p. 1251.e7-1251.e9, nov. 2015b.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. v. 75, n. 4, p. 469–486, 2003.
- MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, v. 136, n. 66, p. 641–655, 2009.
- MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. *Parasitologia Médica*. 8^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2003.
- MARTIN, D. L. et al. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Tropica*, v. 149, p. 15–18, set. 2015.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. et al. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 1, p. 53–59, 2001.
- MARTINO, T. et al. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 12, p. 3115–3122, 2014.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality Related to Chagas Disease and HIV/AIDS Coinfection in Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, p. 4, 2012.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health*, v. 19, n. 8, p. 943–957, 2014.
- MARUYAMA, S. R. et al. Non- Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 11, p. 2088–2092, 2019.
- MAZZETI, A. L. et al. Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: A pre-clinical study. *Biochemical Pharmacology*, v. 148, n. 1, p. 213–221, 2018a.
- MAZZETI, A. L. et al. Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: A pre-clinical study. *Biochemical Pharmacology*, v. 148, n. 3, p. 213–221, 2018b.

MCGRATH, K. E.; FRAME, J. M.; PALIS, J. Early hematopoiesis and macrophage development. *Seminars in Immunology*, v. 27, n. 6, p. 379–387, 2015.

MEIRELLES, M. de; ARAÚJO JORGE, T. de; SOUZA, W. de. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with Macrophages *in vitro*: Dissociation of the Attachment and Internalization Phases by Low Temperature and Cytochalasin B. *Parasitology Research*, p. 7–14, 1982.

MELO, R. C. N. N. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 13, n. 2, p. 279–294, fev. 2009.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitology Research*, v. 101, n. 4, p. 895–905, 2007.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 5, p. 644–653, 2009a.

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

MILITÃO, G. C. G. et al. Comparative cytotoxicity of 2,3,9-trimethoxypterocarpan in leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4, and K562) and human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Natural Medicines*, v. 61, n. 2, p. 196–199, 2007.

MILITÃO, G. C. G. et al. Pterocarpan induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. *Biochimie*, v. 104, n. 5, p. 147–155, set. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Boletim Epidemiológico*, v. 46, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de Setembro de 2017, 2017a. .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores de Vigilância em Saúde descrito segundo a variável raça/cor, Brasil *Boletim Epidemiológico*, 2017b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://conitec.gov.br>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas aguda - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/leishvdf.def>>. Acesso em: 24 jun. 2020a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mortalidade - Brasil. Disponível em:

<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 24 jun. 2020b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 264, de 17 de Fevereiro de 2020, 2020c.

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

MORAES, G. N. de et al. The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. *International Journal of Oncology*, v. 45, n. 5, p. 1949–1958, 2014.

MOREL, C. et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 77, n. 11, p. 6810–6814, 1980.

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

MORILLO, C. A. et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

NETTO, C. D. et al. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 4, p. 1610–1616, 2010.

ODA, J. Y. et al. Myenteric neuroprotective role of aspirin in acute and chronic experimental infections with *Trypanosoma cruzi*. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 29, n. 10, p. e13102, 2017.

OLIVEIRA, A. B. de et al. Estrutura química e atividade biológica de naftoquininas de Bigniniáceas brasileiras. *Química Nova*, v. 13, p. 302–307, 1990.

OLIVEIRA, A. C., SOCCOL, V. T., ROGEZ, H. Prevention methods of foodborne Chagas disease: Disinfection, heat treatment and quality control by TR-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v. 301, p. 34-40, 2019

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. General Information - Chagas Disease. Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=en>. Acesso em: 21 nov. 2019.

PASSOS, L. A. C. et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo* *. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 21, n. 2, p. 223–232, 2012.

PEREIRA, I. R. et al. Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1–16, 2014.

PEREIRA, S. A. de L. et al. O peso do baço em chagásicos crônicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 2, p. 167–170, 1999.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 15, n. 11, p. 1347–1356, 2015.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease cardiomyopathy treatment remains a challenge - Authors' reply. *The Lancet*, v. 391, n. 10136, p. 2209–2210, 2018.

PINTO, F. H. et al. Estudo comparativo do comportamento da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saude Publica*, v. 20, n. 2, p. 133–140, 1986.

PORTES, J. de A. et al. A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, v. 186, n. 3–4, p. 261–269, 2012.

PRADO JR., J. C. do et al. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*, n. 84, p. 100–105, 1998.

QUIÑONES, W. et al. Structure, properties, and function of glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 1-11, 2020.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

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

REIS, F. R. de S. et al. The Therapeutical Potential of a Novel Pterocarpanquinone LQB-118 to Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 341–351, 2013.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. 4^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008.

REY, L. Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas. In: REY, L. (Ed.). *Bases da Parasitologia Médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 37–51.

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, v. 9, n. 10, p. 576–589, 2012.

RIBEIRO, G. A. et al. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 4, p. 789–799, 1 abr. 2013.

RIBEIRO, M. et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model.

Experimental Parasitology, v. 162, p. 1–6, mar. 2016.

RIÇA, I. G. et al. Anti-inflammatory properties of pterocarpanquinone LQB-118 in mice. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 18, p. 4415–4423, 2016.

RIOS, A. et al. Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 1, p. 3–8, 2018.

RODRIGUES, J. P. F. et al. *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. *Nitric Oxide*, v.66, p. 43-52, 2017.

RODRIGUEZ, H. O. et al. *Trypanosoma cruzi* strains cause different myocarditis patterns in infected mice. *Acta Tropica*, v. 139, p. 57–66, 2014.

ROMANHA, A. J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease : A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SANGENIS, L. H. C. et al. First Report of Acute Chagas Disease By Vector Transmission in Rio De Janeiro State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 4, p. 361–4, 2015.

SCHNEIDER, C. M. et al. Effects of Physical Activity on Creatine Phosphokinase and the Isoenzyme Creatine Kinase-MB. *Annals of Emergency Medicine*, v. 25, n. 4, p. 520–524, 1995.

SELVAM, C. et al. Pterocarpan scaffold : A natural lead molecule with diverse pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 128, p. 219–236, 2017.

SILBER, A. M.; FERREIRA, M. U. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: FERREIRA, M. U. (Ed.). *Parasitologia Contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 33–45.

SILVA, A. A. et al. Chagas' disease encephalitis: Intense CD8⁺ lymphocytic infiltrate is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clinical Immunology*, v. 92, n. 1, p. 56–66, 1999.

SILVA, D. R. da et al. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 211–216, 2012.

SILVA, E. B. da et al. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 130, p. 39–50, 2017.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, C. B. V. De. Um Panorama Atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com Ênfase na β -Lapachona e Derivados. *Química Nova*,

v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SILVA, R. S. F. et al. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 4, p. 526–530, 1 abr. 2006.

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 4, 2012.

SOARES, M. B. P. et al. Gene Expression Changes Associated with Myocarditis and Fibrosis in Hearts of Mice with Chronic Chagasic Cardiomyopathy. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 202, n. 3, p. 416–426, 15 ago. 2010.

SOUZA, E. M. de et al. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitology Research*, v. 87, n. 7, p. 513–520, 2001.

SOUZA, M. A. de; ALENCAR, A. A. On the tissular parasitism of *Trypanosoma cruzi* Y strain in swiss mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, p. 316–321, 1984.

SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, v. 104, n. May, p. 89–100, 2009.

SOUZA, W., CARVALHO, T. U., BARRIAS, E. S.. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. In: TELLERIA, J., TIBAYRENC, M. (Ed). *Americam Trypanosomiasis, Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier, 2017. p.401-427

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges *Global Heart Elsevier*, , 1 set. 2015.

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

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World Journal of Biological Chemistry*, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.

TAFURI, W. L. et al. Miocardite chagásica aguda humana: provável agressão à célula cardíaca pel granulócito eosinófilo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 122–124, 1983.

TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 2011

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.

VAZQUEZ, B. P. et al. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. *Parasites and*

Vectors, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2015.

VIEIRA, J. L. et al. Chagas Cardiomyopathy in Latin America Review. *Current Cardiology Reports*, v. 21, n. 8, p. 1–8, 2019.

VIEIRA, N. C. et al. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 1676–1682, 2008.

VORRARO, F. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection in Genetically Selected Mouse Lines : Genetic Linkage with Quantitative Trait Locus Controlling Antibody Response. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1–15, 2014.

WENG, J. R. et al. Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 3, p. 404–407, 2003.

WILKINSON, S. R. et al. Trypanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: Current Treatments and Future Perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | What is Chagas disease? Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em: 8 jun. 2018a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 2 jun. 2018b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO and Mundo Sano Foundation to facilitate access to paediatric treatment of Chagas disease. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/who_facilitate_access_paediatric_treatment/en/>. Acesso em: 3 jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>. Acesso em: 05 out. 2020a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018, 2020b.

YAMAGUCHI, H. Potential of Ravuconazole and its Prodrugs as the New Oral Therapeutics for Onychomycosis. *Medical Mycology Journal*, v. 57, p. 93–110, 2016.

YANG, X. qiang et al. The protective effect of recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine on a *Clostridium difficile*-infected animal model. *BMC Gastroenterology*, v. 13, n. 117, p. 1–13, 2013.

YENESEW, A. et al. The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burttii*. *Acta Tropica*, v. 123, n. 2, p. 123–127, ago. 2012.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature:

second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, abr. 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? Revista da Biologia, v. 6b, p. 44–48, jun. 2011.

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

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Tropica, v. 184, p. 38–52, ago. 2018.