



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruno Fonseca de Azevedo

**Ação da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o metabolismo mitocondrial  
do *Trypanosoma cruzi***

Rio de Janeiro

2023

Bruno Fonseca de Azevedo

**Ação da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o metabolismo mitocondrial do**  
*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.<sup>a</sup> Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira

Rio de Janeiro

2023

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

A994 Azevedo, Bruno Fonseca de.  
Ação da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o metabolismo mitocondrial do  
Trypanosoma cruzi / Bruno Fonseca de Azevedo – 2023.  
86 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira

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

1. Trypanosoma cruzi - Teses. 2. Mitocôndria - Teses. 3. Chagas, doença de -  
Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses. I. Silva, Sílvia Amaral Gonçalves da. II. Nogueira,  
Natália Pereira de Almeida. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade  
de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Bruno Fonseca de Azevedo

**Ação da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o metabolismo mitocondrial do  
*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 08 de dezembro de 2023.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcia Cristina Paes  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Helena Keiko Toma  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2023

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a presente tese para Deus por tudo o que tem me proporcionado, em especial saúde, proteção e por toda a força nos momentos de desafio pois sei que sempre sou amparado nesses momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer em primeiro lugar aos meus pais Wilson Lima de Azevedo e Fátima Santos Fonseca por todo apoio necessário e por sempre estarem comigo inclusive nos momentos de desafio.

Agradeço às minhas orientadoras Sílvia e Natália por todo o direcionamento do presente trabalho e por proverem todo o recurso necessário para a realização do mesmo.

Quero agradecer a equipe do laboratório de Imunofarmacologia parasitária, Rosiane, Andréia, Larissa, Michelly, Bianca, Thayssa, Gabriela, Johnata, Juliana e Kátia, na ajuda do presente trabalho, além do grupo do professor Eduardo Torres pela colaboração no processamento e pranchas de microscopia eletrônica em especial Ander e Ludmila, e à professora Patrícia Dutra e seu grupo em especial Raquel e Shay além de todo o grupo do departamento de parasitologia que contribuiu para o presente trabalho.

Agradeço também ao professor Eduardo Torres pela revisão do trabalho e por toda a ajuda no direcionamento e suporte das microscopias de transmissão e varredura. Também agradeço a Priscila da urogenital por toda a colaboração na trimagem e corte das amostras de microscopia. E não esquecendo de agradecer a Adélia e Carla do Cenabio pelas imagens da microscopia eletrônica de transmissão e ao Hirschel do Nanofab pelas imagens da microscopia eletrônica de varredura, além das próprias instituições Cenabio e Nanofab pelo suporte.

Quero agradecer às professoras Marcia Paes, Natália Nogueira e sua equipe por mais uma vez terem me recebido muito bem em seu laboratório e colaborado com a cessão de materiais e equipamentos para o presente trabalho.

Agradeço também à equipe do departamento de Farmacologia pela ajuda e uso dos equipamentos.

Agradeço também á todos que eu possa não ter me recordado aqui mas que colaboraram direta ou indiretamente com o presente trabalho.

Agradeço a todos os membros que fazem parte da banca examinadora dessa tese.

Agradeço ao suporte financeiro dado ao presente trabalho à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

## RESUMO

AZEVEDO, Bruno Fonseca de. **Ação da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o metabolismo mitocondrial do *Trypanosoma cruzi***. 2023. 86 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, uma das doenças tropicais negligenciadas endêmica em países da América Latina. Entre os países afetados, o Brasil apresenta o maior número de casos com estimativa de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas. A doença de Chagas causa um importante impacto socioeconômico e o seu tratamento é limitado ao uso de dois fármacos, o benznidazol e o nifurtimox, que são tóxicos e com eficácia insatisfatória na fase crônica da infecção. Portanto, a pesquisa de novas alternativas de tratamento se torna necessária. A pterocarpanoquinona sintética LQB-118 apresenta atividade antitumoral e antiparasitária. Em *Leishmania sp* a molécula apresentou como alvo a mitocôndria do parasito. Mostramos previamente que a LQB-118 também inibe a multiplicação *in vitro* do *T. cruzi* (epimastigotas e amastigotas). O objetivo do presente trabalho foi estudar *in vitro* o modo de ação da LQB-118 sobre o *T. cruzi*, tendo como alvo a mitocôndria do parasito. Para avaliar o impacto na produção de ROS, consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial e ATP intracelular, formas epimastigotas foram incubados com 2,5 (IC<sub>50</sub>) e 25 µM LQB-118 por 24 e 48 horas. A LQB-118 induziu a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial no parasito e aumentou o consumo de O<sub>2</sub> nos diferentes estados respiratórios a 2,5 µM, havendo diminuição no consumo a 25 µM. Entretanto, não foi observada alteração na concentração de ATP intracelular no parasito. Houve também aumento no consumo de O<sub>2</sub> não mitocondrial nos dois tempos de tratamento. Para avaliar o efeito da LQB-118 no processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, epimastigotas foram tratados sob indução da metaciclogênese *in vitro*. Após 96 horas houve diminuição do número de tripomastigotas metacíclicos. Além disso, o tratamento de tripomastigotas metacíclicos com a LQB-118 reduziu a capacidade de infecção de macrófagos. Corroborando com esses dados, a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão e varredura de epimastigotas mostrou que o tratamento com a LQB-118 provoca danos importantes ao parasito sobretudo na mitocôndria, promovendo seu inchaço e desorganização, além de outras alterações celulares como a presença de vacúolos autofágicos, condensação da cromatina nuclear, encolhimento celular e perda da integridade de membrana. Em conjunto, esses resultados mostram que, assim como observado em *Leishmania sp*, a mitocôndria é um alvo da LQB-118 na sua ação antiparasitária contra o *T. cruzi*. A LQB-118 reage com o oxigênio molecular induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria que causam alterações bioquímicas e morfológicas sobre o *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; tratamento; mitocôndria; pterocarpanoquinona; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

AZEVEDO, Bruno Fonseca de. **Action of pterocarpanquinone LQB-118 on mitochondrial metabolism of *Trypanosoma cruzi***. 2023. 86 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The hemoflagellate protozoa *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, one of the neglected tropical diseases endemic in Latin America. Among affected countries, Brazil presents the highest number of cases with an estimated 1.9 to 4.6 million people infected. Chagas disease causes a high socioeconomic impact and the treatment is still restricted to two drugs, benznidazole and nifurtimox, which present several side effects and unsatisfactory efficacy in the chronic phase of the disease. Therefore, the search for new treatment alternatives is necessary. The synthetic pterocarpanquinone LQB-118 presents antitumor and antiparasitic activity. In *Leishmania sp*, the molecule presents as its target the parasite mitochondria. Our group previously showed that LQB-118 also inhibits replication *in vitro* of *T. cruzi* (epimastigotes and amastigotes). The objective of this study was to investigate *in vitro* the mode of action of LQB-118 on *T. cruzi*, targeting the parasite mitochondria. To investigate the impact on ROS production, mitochondrial oxygen consumption and ATP levels, epimastigotes were incubated with 2.5 (IC<sub>50</sub>) and 25 µM LQB-118 for 24 and 48 hours. LQB-118 induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondrial production in the parasite and increased O<sub>2</sub> consumption in the mitochondrial respiration states with 2.5 µM, while with 25 µM consumption was the lowest. Meanwhile, it wasn't seen changes on ATP levels in the parasite. LQB-118 also increased non-mitochondrial O<sub>2</sub> consumption in both treatment times. To evaluate the effect of LQB-118 on *T. cruzi* metacyclogenesis, epimastigotes were treated under metacyclogenesis induction *in vitro*. After 96 hours the quantity of metacyclic trypomastigotes decreased. In addition, treatment of metacyclic trypomastigotes with LQB-118 reduced the infectivity in peritoneal macrophages. Corroborating these results, ultrastructural analysis by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy of epimastigotes showed that the treatment with LQB-118 induced changes on the parasite, especially in the mitochondria, exhibiting swelling and desorganization, in addition to other cellular changes as a presence of autophagic vacuoles, condensation of nuclear chromatin, shrinkage and loss of membrane integrity. Together, these results show that, as seen in *Leishmania sp*, mitochondria is the target of LQB-118 in its antiparasitic action against *T. cruzi*. LQB-118 reacts with molecular oxygen inducing generation of reactive oxygen species on mitochondria that lead to biochemical and morphological changes on *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; treatment; mitochondria, pterocarpanquinone; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
Figura 2 –	Formas dos tripomastigotas sanguíneos.....	17
Figura 3 –	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
Figura 4 –	Distribuição geográfica de casos da Doença de Chagas pelo mundo.....	22
Figura 5 –	Figura ilustrativa dos sinais de porta de entrada do parasito na fase aguda da doença de Chagas.....	23
Figura 6 –	Figura ilustrativa destacando algumas características da cardiomiopatia chagásica.....	24
Figura 7 –	Figura ilustrativa exibindo a radiologia do esôfago e cólon, representando as megasíndromes.....	25
Figura 8 –	Estrutura química dos fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas.....	26
Figura 9 –	Figura ilustrativa exibindo o mecanismo de ação dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.....	27
Figura 10 –	Classificação das quinonas.....	32
Figura 11 –	Síntese da pterocarpanoquinona LQB-118.....	34
Figura 12 –	Alterações morfológicas em <i>Leishmania amazonensis</i> causadas pelo tratamento com a LQB-118.....	36
Figura 13 –	Figura ilustrativa do sistema de transporte de elétrons exibindo os 4 complexos enzimáticos.....	38
Figura 14 –	Sistema de transporte de elétrons do <i>T. cruzi</i> exibindo os complexos enzimáticos.....	40
Figura 15 –	Efeito da LQB-118 sobre a infectividade de tripomastigotas metacíclicos.....	52
Figura 16 –	Análise da ultraestrutura externa de epimastigotas tratados com a LQB-118 através de microscopia eletrônica de varredura.....	60
Figura 17 –	Análise da ultraestrutura de epimastigotas tratados com a LQB-118 usando a microscopia eletrônica de transmissão.....	63

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 –	Valores de IC50 da LQB-118 sobre as principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> .....	41
Gráfico 1 –	Efeito da LQB-118 sobre a metaciclogênese.....	50
Gráfico 2 –	Determinação de ROS em parasitos tratados com a LQB-118.....	53
Gráfico 3 –	Avaliação do consumo de O <sub>2</sub> em parasitos tratados com a LQB-118.....	54
Gráfico 4 –	Análise da concentração de ATP pós tratamento com a LQB-118.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain-heart-infusion
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTU	Discrete Typing Units
DNDi	Drugs for Neglected Diseases
ETS	Capacidade máxima respiratória
FCR	Razão de controle de fluxo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	Peroxidase de Rábano
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% dos parasitos
IF	Índice de Infecção
LCM	Leucemia mielóide crônica
LQB	Laboratório de Química Bioorgânica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NOX	NADH oxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Polymerase Chain Reaction
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCR	Capacidade de reserva
TAU	Urina Artificial de Triatomíneo
TAU3AAG	Urina Artificial de Triatomíneo suplementado com prolina, glutamato, aspartato e glicose
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

C	Celsius
mg	Miligrama
kg	Kilograma
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Íon superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Fe	Ferro
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
%	Porcentagem
Ca	Cálcio
β	Beta
Cu	Cobre
ml	Mililitros
μM	Micrómetro
μm	Micromolar
mM	Milimolar
μl	Microlitros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
nm	Nanometro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
μg	Micrograma
M	Molar
pH	Potencial hidrogeniônico

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
2.1	<b>Geral</b> .....	42
2.2	<b>Específicos</b> .....	43
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1	<b>Pterocarpanoquinona LQB-118</b> .....	43
3.2	<b>Parasito, cultivo e manutenção de epimastigotas</b> .....	43
3.3	<b>Obtenção de tripomastigotas metacíclicos <i>in vitro</i></b> .....	43
3.4	<b>Atividade da LQB-118 sobre a metaciclogênese</b> .....	44
3.5	<b>Infecção experimental e considerações éticas</b> .....	44
3.6	<b>Influência da LQB-118 sobre a infectividade de tripomastigotas metacíclicos</b> .....	45
3.7	<b>Determinação de espécies reativas de oxigênio de parasitos tratados com a LQB-118</b> .....	46
3.8	<b>Avaliação do consumo de O<sub>2</sub> através de respirometria de alta resolução</b> .....	47
3.9	<b>Quantificação de ATP intracelular</b> .....	48
3.10	<b>Análise ultraestrutural de epimastigotas tratados através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)</b> .....	48
3.11	<b>Análise estatística</b> .....	49
4	<b>RESULTADOS</b> .....	50
4.1	<b>Atividade da LQB-118 sobre a metaciclogênese</b> .....	50
4.2	<b>Influência da LQB-118 sobre a infectividade de tripomastigotas metacíclicos</b> .....	51
4.3	<b>Análise na formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de parasitos tratados com a LQB-118</b> .....	53
4.4	<b>Análise do consumo de O<sub>2</sub> pós tratamento com a LQB-118</b> .....	54
4.5	<b>Quantificação de ATP intracelular</b> .....	57
4.6	<b>Análise da ultraestrutura externa de epimastigotas tratados através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	58

4.7	<b>Análise da ultraestrutura de epimastigotas tratados usando a Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....</b>	61
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	64
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	72
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	73

## INTRODUÇÃO

### Aspectos gerais e histórico

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, uma enfermidade endêmica na América Latina, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo considerada um grande problema de saúde pública e social (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; GUARNER, 2019). Na América Latina, estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com 29 a 30 mil novos casos anuais e 70 milhões de pessoas vivem em condições que colocam-nas no risco de contrair a doença. Estimativas apontam que a doença causa 12.000 mortes por ano. (WHO, 2022).

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada afetando populações que vivem em áreas rurais e periurbanas em condições sócio-econômicas vulneráveis (MAZZETI *et al*, 2021). Os fatores sócio-econômicos como a pobreza e a desnutrição, assim como a falta no acesso à educação e saúde influenciam diretamente na progressão da doença que, especificamente na doença de Chagas, leva a um risco aumentado em evoluir para a fase crônica da doença. As manifestações crônicas da doença de Chagas tornam indivíduos economicamente ativos inabilitados levando à perda de produtividade com grande impacto na morbidade (VIOTTI *et al*, 2009; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A doença de Chagas e seu agente foram descobertos em 1909 quando Carlos Chagas detectou o parasito em uma criança chamada Berenice na cidade de Lassance, Minas Gerais. Ela teve febre, edema facial e síndrome de linfonodos esplênicos hepáticos. Carlos Chagas coletou amostras de barbeiros e enviou para o Instituto Nacional de Soroterapia onde Oswaldo Cruz, inoculou em macacos. Depois de 30 dias quando Carlos Chagas examinou o sangue desses macacos e observou, o *Trypanosoma cruzi* foi detectado (CHAGAS, 1909; CHAO *et al*, 2020). Existem relatos de pesquisadores que a doença de Chagas já existia há 9000 anos atrás quando múmias exumadas de sítios arqueológicos no Peru e Chile foram estudadas e, através da técnica de PCR, foi confirmada a presença de DNA do cinetoplasto do *T. cruzi* (AUFDERHEIDE *et al*, 2004; CHAO *et al*, 2020).

## O protozoário *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* pertence a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (REY, 2010; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020). A Ordem Kinetoplastida contempla protozoários que possuem um ou dois flagelos que emergem da bolsa flagelar e uma única mitocôndria que contem o cinetoplasto, uma estrutura contendo DNA extranuclear correspondendo ao genoma mitocondrial parasitário. A ordem Kinetoplastida é composta por duas famílias que são a Bodonidae e Trypanosomatidae (SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006; RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012).

A família Trypanosomatidae, de grande interesse médico, apresenta parasitos de insetos, vegetais e de vertebrados possuindo o ciclo heteroxeno que envolve 2 ou mais hospedeiros ou monoxenos, parasitos com apenas 1 hospedeiro (SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006). Os flagelados dessa família podem se apresentar sob diversas formas evolutivas tais como amastigota, promastigota, coanomastigota, epimastigota, tripomastigota e opistomastigota, que se diferem, principalmente, de acordo com a localização do cinetoplasto em relação ao núcleo, a forma do corpo celular, a presença ou não de membrana ondulante e o tamanho do flagelo. Dentro dessa família estão os gêneros de importância médica *Trypanosoma* e *Leishmania* (REY, 2010; RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012).

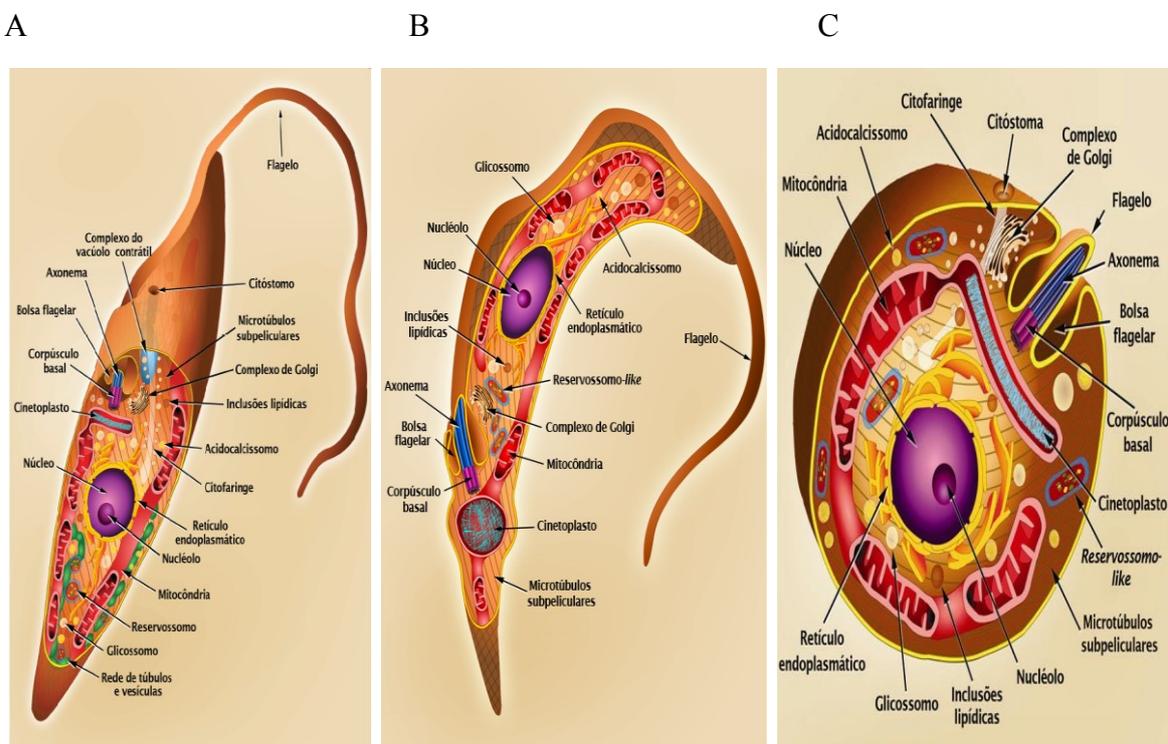
O gênero *Trypanosoma* é dividido em dois grupos de acordo com o comportamento no hospedeiro invertebrado. O grupo Stercoraria possui tripanossomas que são liberados na porção posterior do tubo digestório do hospedeiro invertebrado, como o *Trypanosoma cruzi*. Já o grupo Salivaria é formado por aqueles que são inoculados através da porção anterior do vetor como o *Trypanosoma brucei* e o *Trypanosoma rangeli* (EL-BAHNASAWY et al, 2014).

O *Trypanosoma cruzi* é uma espécie heterogênea com grande diversidade genética. Pela sua diversidade, as cepas da espécie são classificadas em 6 discrete typing units (DTUs), que se diferem pela distribuição geográfica, infectividade e resposta a terapia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; GUARNER, 2019). A TcI é dispersa através das Américas estando presente mais no ciclo silvestre. Nesse grupo temos as cepas CA-1, Colombiana, Dm28c e Sylvio<sup>f</sup> X10 c11. (CURA et al, 2010). A TcII predomina nas regiões central e sul da América do Sul e tem sido isolada nos ciclos de transmissão doméstico. As cepas Y, Peruana e Esmeraldo c13 pertencem a esse grupo (CARRANZA et al, 2009). TcIII e TcIV estão mais associadas ao ciclo silvestre, estando a TcIII presente nos nortes da Venezuela e Argentina e

tendo como principal reservatório tatus. Já a TcIV é encontrada nas Américas do Norte e Sul tendo como principais hospedeiros primatas selvagens e quatis na América do Sul e guaxinim na América do Norte. CM17, M5631 cl5 e M6241 cl6 pertencem ao grupo TcIII e CanIII cl1 e Dog Theis pertencem ao TcIV (MONTEIRO et al, 2010; ENRIQUEZ et al, 2013). A TcV e TcVI estão mais presentes em países mais ao Sul da América do Sul, com reservatórios não completamente bem definidos. Do grupo TcV temos MN cl2, NR cl3 e SO3 cl5. Já do grupo TcVI tem-se a CL Brener, RA, Tulahuen e Tulahuen cl2 (ENRIQUEZ et al, 2013; MESSENGER et al, 2016). A TcI é reportada ser mais resistente ao tratamento com Benznidazol do que os parasitos das outras DTUs. Comparando a infectividade para mamíferos, cepas TcII são mais infectivas do que as TcI (ZINGALES et al, 2009; ZINGALES, 2018).

As principais formas evolutivas do *T. cruzi* são: epimastigota, tripomastigota e amastigota. A figura 1 mostra essas formas evolutivas e suas organelas.

Figura 1 – Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



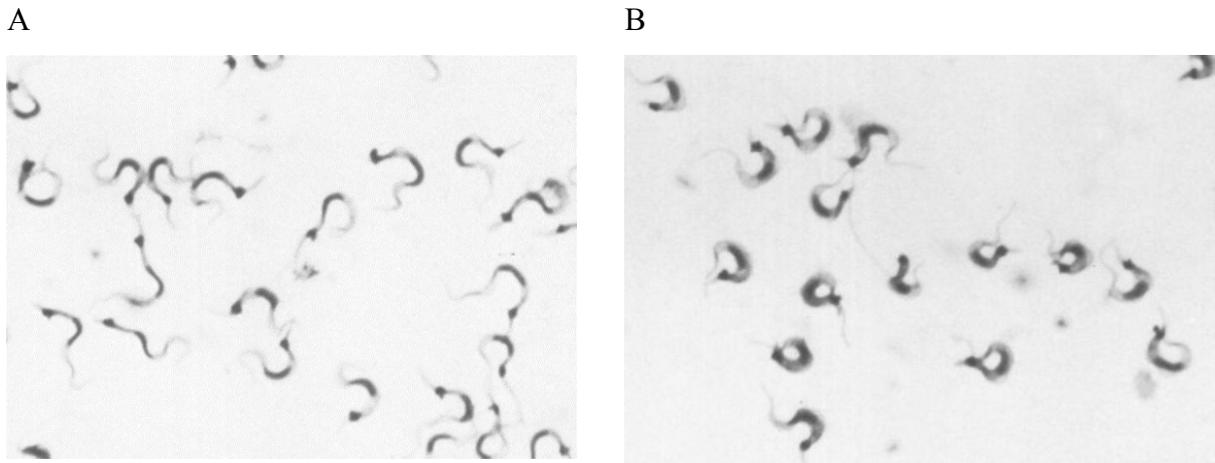
Legenda: **(A)** epimastigota - cinetoplasto adjacente ao núcleo; **(B)** tripomastigota - cinetoplasto posterior ao núcleo; **(C)** amastigota - Forma intracelular.

Fonte: Adaptado de Teixeira et al, 2012.

No hospedeiro vertebrado encontram-se as formas evolutivas tripomastigota sanguínea e a amastigota (forma intracelular) e no hospedeiro invertebrado encontram-se as formas evolutivas epimastigota e tripomastigota metacíclico. A forma epimastigota apresenta corpo alongado, cinetoplasto adjacente ao núcleo, o flagelo percorre externamente uma pequena extensão da célula, sendo aderido à membrana e esse flagelo torna-se livre depois de ultrapassar a extremidade anterior. É a forma encontrada no intestino do hospedeiro invertebrado, multiplicando-se por divisão binária (Figura 1A) (DE SOUZA, 2002; REY, 2010).

A forma tripomastigota apresenta o corpo alongado e achatado, o cinetoplasto é arredondado e posterior ao núcleo sendo muitas vezes próximo da extremidade posterior. O flagelo percorre externamente toda a extensão da célula, aderido à membrana e tornando-se livre na extremidade anterior. Esse flagelo ao percorrer a extensão da célula dá origem à membrana ondulante. Estas formas não se dividem. Os tripomastigotas sanguíneos medem cerca de 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2  $\mu\text{m}$  de largura, são ágeis e se encontram no sangue periférico dos mamíferos (DE SOUZA, 2002; REY, 2010). Entre os tripomastigotas sanguíneos existem as formas delgadas e as formas largas (Figura 2). As formas delgadas (Figura 2A) possuem um cinetoplasto um pouco afastado da extremidade posterior onde essa extremidade é longa e delgada e a movimentação dessa forma é rápida e direcional. Já nas formas largas (Figura 2B) o cinetoplasto fica muito próximo da extremidade posterior e a movimentação dessas formas é mais lenta e não direcional. As formas delgadas tendem rapidamente a desaparecer da circulação, ou por terem penetrado nas células do hospedeiro ou por terem sido destruídas pelo sistema imunológico do hospedeiro e parecem ser incapazes de evoluir no tubo digestivo dos insetos quando são ingeridos junto com o sangue. Já as formas largas pouco penetram nas células do hospedeiro mas persistem muito tempo no sangue já que são mais resistentes à lise pelo complemento e à fagocitose pelos macrófagos e evoluem muito bem no tubo digestivo dos insetos (SCHLEMPER JR. et al, 1986).

Figura 2 - Formas dos tripomastigotas sanguíneos



Legenda: **(A)** Forma delgada; **(B)** Forma larga.  
 Fonte: Adaptado de Schmatz; Boltz; Murray, 1983.

As formas tripomastigotas metacíclicas medem cerca de 17  $\mu\text{m}$ , sendo finas e muito ativas. Essa forma está presente na porção final do intestino do hospedeiro invertebrado. Quando o inseto faz um novo repasto sanguíneo, essas formas são expulsas junto com as fezes do inseto e são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Os tripomastigotas metacíclicos conseguem viver em temperaturas mais altas em torno de 37°C, e assim conseguem dar continuidade ao seu ciclo biológico no hospedeiro vertebrado (Figura 1B) (DE SOUZA, 2002; REY, 2010).

A forma amastigota possui pequenas dimensões com cerca de 4  $\mu\text{m}$ , é arredondada, possui pouco citoplasma e núcleo grande, redondo e excêntrico. O cinetoplasto se situa perto do núcleo e o flagelo é muito curto situando-se dentro da bolsa flagelar. É a forma intracelular encontrada nos hospedeiros vertebrados e é capaz de se dividir dentro da célula hospedeira por divisão binária (Figura 1C) (DE SOUZA, 2002; REY, 2010).

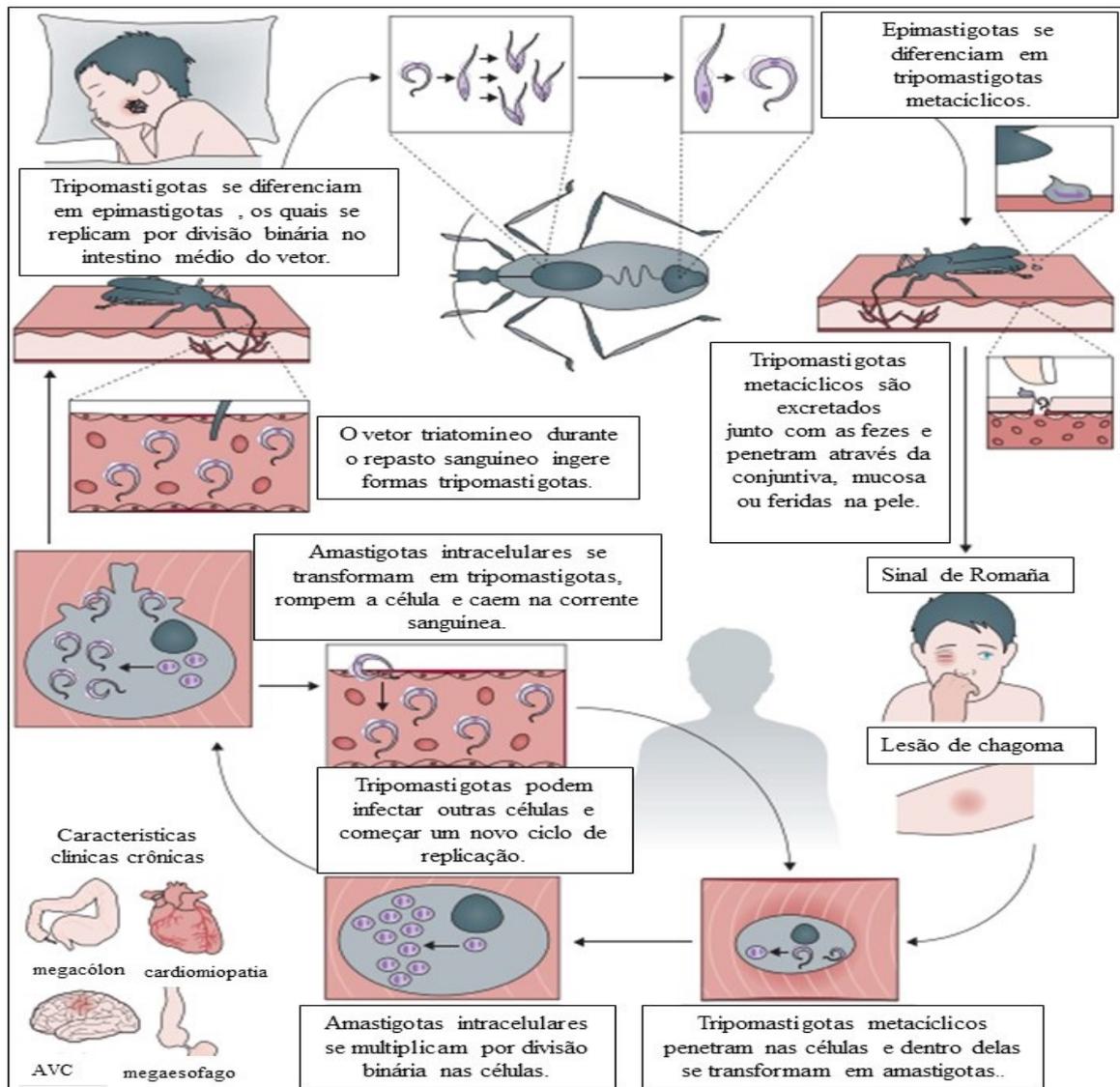
Os aspectos da biologia celular do *T. cruzi* estão bem definidos através de análises ultraestruturais e as análises da ultraestrutura do parasito auxiliam em diversos estudos como a pesquisa do mecanismo de ação de moléculas sobre o parasito (DE SOUZA, 2002, MENNA-BARRETO et al, 2009).

## Ciclo biológico

O ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura 3) é heteroxênico, envolvendo hospedeiros vertebrados e o inseto vetor que são triatomíneos hematófagos. O ciclo se inicia quando um triatomíneo não infectado, ao fazer o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere junto com o sangue as formas tripomastigotas sanguíneas. No intestino médio do triatomíneo essas formas se transformam em epimastigotas e se multiplicam por divisão binária, colonizando o intestino do vetor. Na porção posterior e na ampola retal elas aderem ao epitélio intestinal, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes não replicativos e se acumulam no intestino posterior e na ampola retal. Quando o triatomíneo fizer um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado não infectado, esses tripomastigotas metacíclicos serão eliminados junto com as fezes e urina na pele ou mucosa do hospedeiro. Essas formas após liberadas na mucosa ou conjuntiva do indivíduo podem penetrar ativamente pelas mesmas ou pode haver penetração ativa através de alguma injúria na pele. A própria picada do vetor pode ser local de entrada pois causa um prurido e o indivíduo, ao coçar, arrasta as fezes junto com os tripomastigotas liberados para o local da picada. A maioria das espécies de triatomíneos tem o hábito de fazer a hematofagia no período noturno. Depois de penetrar, os tripomastigotas metacíclicos podem ser fagocitados por macrófagos ou invadir diretamente células reticuloendoteliais e células conectivas. Dentro dessas células ficam temporariamente nos vacúolos parasitóforos, de onde escapam para o citoplasma, onde se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária. Quando a célula estiver repleta de amastigotas, essas se diferenciam novamente em tripomastigotas. Com a intensa movimentação dessas formas, a célula se rompe liberando os tripomastigotas que podem cair na corrente sanguínea, sendo chamados tripomastigotas sanguíneos. Esses tripomastigotas liberados podem infectar células de tecidos adjacentes ou se espalhar pela corrente sanguínea ou pela via linfática para locais distantes, ampliando a infecção. Os tripomastigotas podem infectar vários tipos celulares incluindo células musculares cardíacas, células musculares periféricas, células da musculatura lisa, células endoteliais, células da musculatura esquelética, células ganglionares, células do sistema nervoso central e periférico, do sistema reticoendotelial ou do tecido adiposo. Quando um triatomíneo não infectado fizer seu repasto sanguíneo, junto com o sangue ele ingere as formas tripomastigotas sanguíneas, que no intestino médio se transformam em epimastigotas

dando continuidade ao ciclo (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020).

Figura 3 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Pérez-Molina; Molina, 2018.

## Transmissão

A principal via de transmissão do *T. cruzi* na região endêmica da América Latina é a vetorial (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). As principais espécies de triatomíneos que são

vetores da doença incluem o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis*. Esses insetos tem o hábito de fazer a hematofagia no período noturno quando o indivíduo está dormindo, defecando no local do repasto sanguíneo podendo ser pele, mucosa ou conjuntiva e junto com as excretas o parasito é liberado, penetrando ativamente no hospedeiro através desses locais ou através de injúrias na pele. Esses insetos podem transmitir o parasito para inúmeros animais como cachorros, gatos, roedores, porcos, gambás, guaxinin e tatus, além do homem (GUARNER, 2019; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020). O contato desses vetores com o homem é mais comum em áreas rurais onde casas possuem telhados de palha e a pobreza é um fator determinante para a manutenção do ciclo pois facilita a colonização desses triatomíneos no ambiente domiciliar (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Além do ambiente domiciliar, esses insetos podem ocupar o peridomicílio, o intradomicílio e o ambiente silvestre (LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020).

No Brasil, entre 2015 e 2019, 30 % dos municípios brasileiros notificaram a presença de triatomíneos, com os estados de Ceará, Pernambuco, Piauí, Bahia e Tocantins possuindo o maior número de municípios de recorrência no aparecimento de triatomíneos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). A vigilância entomológica tem sido uma estratégia adotada no país para eliminar focos de infestação de triatomíneos das residências, além das ações de educação em saúde e ambiental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Outros meios de transmissão são através da doação de sangue, órgãos transplantados, infecção congênita, transmissão oral e acidentes laboratoriais (GUARNER, 2019; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020). Nos últimos anos, a migração de pessoas infectadas de áreas endêmicas para a Europa e EUA, além de outras áreas, levou ao aumento do número de casos da doença de Chagas nessas áreas não endêmicas através da doação de sangue e órgãos ou pela transmissão vertical (QUINTERO-PERTUZ et al, 2022).

A transmissão oral está relacionada ao consumo de alimentos ou sucos como caldo de cana e açaí contendo fezes de triatomíneos e carnes cruas ou mal cozidas contendo tripomastigotas metacíclicos. A doença de Chagas, através da transmissão oral, tem sido declarada uma das mais importantes doenças de origem alimentar devido ao aumento de casos nos últimos anos, sendo de grande relevância no Brasil (VELÁSQUEZ-ORTIZ; RAMÍREZ, 2020). No período de 2000 a 2010 foram notificados mais de 1000 casos agudos no Brasil em 138 surtos nos quais 776 casos foram relacionados a epidemias de transmissão oral (DÍAZ; GONZÁLEZ, 2014). Em 2005, em Santa Catarina, houve um surto de doença de Chagas relacionado ao consumo de cana de açúcar onde no processamento da cana houve a contaminação com fezes de triatomíneos infectados ou a moagem da cana com triatomíneos

(STEINDEL et al, 2008). Em 2006, no Pará, houve um surto relacionado ao consumo de açaí. Também houveram pequenos surtos na Bahia, Ceará e Amazônia (DIAS et al, 2008; DE GÓES et al, 2009; SOUZA-LIMA et al, 2013). Ocorreram surtos também na Colômbia, em 2008, relacionados ao consumo de suco de laranja contaminado, na Venezuela, em 2007, devido a ingestão de suco de goiaba contaminado e na Bolívia, em 2010, pelo consumo de frutos locais e vegetais que são consumidos sem cozimento (FILIGHEDDU et al, 2016). Em 2015, no Rio Grande do Norte, houveram surtos relacionados à ingestão de caldo de cana contaminado por triatomíneos infectados (VARGAS et al, 2018). Em 2019, no estado de Pernambuco, o surto da doença foi resultado do consumo de bebida ou alimento contaminado em um evento religioso (GÓES, 2019; MONSALVE-LARA et al, 2021). Através da transmissão oral ocorre invasão e replicação do parasito na mucosa gástrica que a partir daí, se o individuo não for tratado, a infecção se dissemina para outros tecidos (FILIGHEDDU et al, 2016).

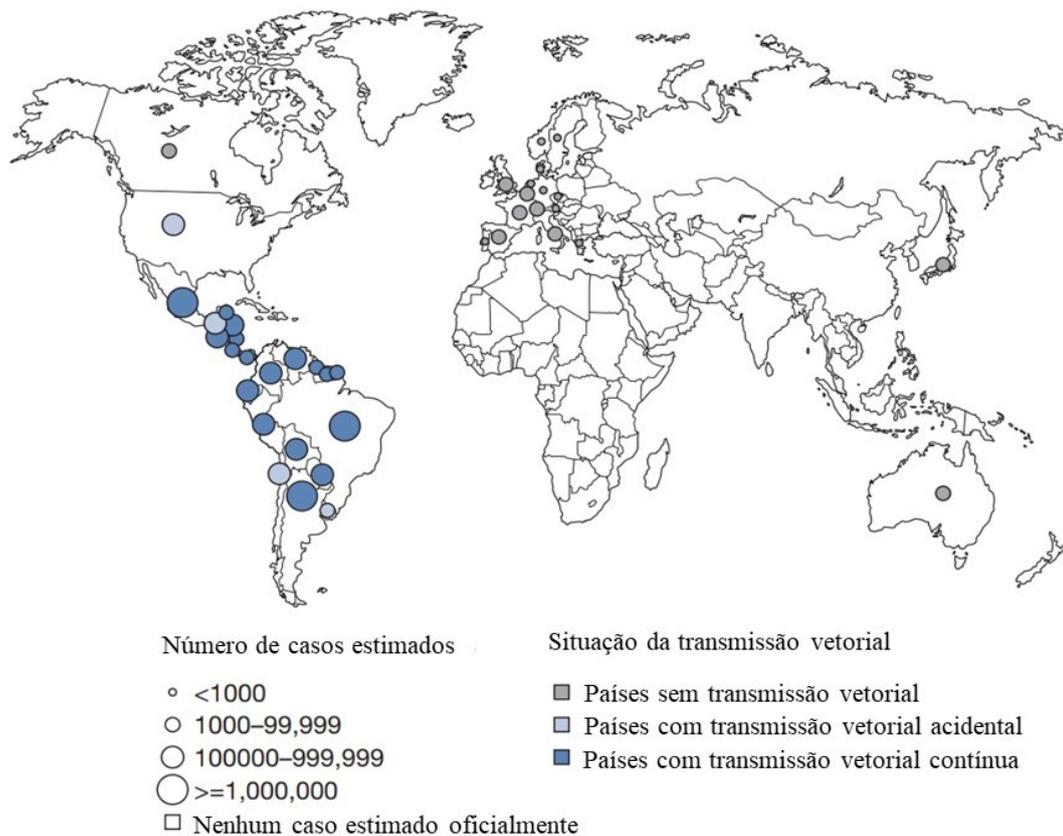
## **Epidemiologia**

A doença de Chagas é endêmica na América Latina, distribuída amplamente desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e Chile. A migração de indivíduos com a doença, muitas vezes assintomáticos, de áreas rurais para áreas urbanas, tem permitido que a doença se espalhe para esses locais e assim o ciclo urbano se mantém principalmente em áreas periféricas urbanas através da transmissão vetorial, além da transmissão congênita e doação de sangue (BOWMAN *et al*, 2008; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Do ponto de vista epidemiológico existem 3 ciclos de transmissão da doença de Chagas: (1º) O ciclo silvestre onde o parasito circula entre mamíferos e triatomíneos silvestres, (2º) o ciclo peridoméstico onde triatomíneos infectados do ambiente silvestre visitam o domicílio favorecidos muitas vezes pela proximidade do domicílio com o ambiente silvestre, transmitindo o *Tyrpanosma cruzi* ao homem e animais domésticos e o parasito, assim, circula entre os ambientes silvestre e doméstico e (3º) o ciclo doméstico em que triatomíneos que se domiciliaram colonizam e se multiplicam dentro de habitações precárias estando em contato direto com o homem e animais domésticos podendo lhes transmitir o parasito (REY, 2010; ZINGALES, 2018).

A prevalência de infecção pelo *T. cruzi* é mais alta em países como Bolívia, Argentina, Paraguai, Equador, El Salvador e Guatemala (Figura 4). Nos EUA, a transmissão tem se propagado em algumas áreas de alguns estados do sul do país, com poucos casos autóctones reportados. Devido a programas de controle vetorial e testagem compulsória de bancos de sangue, a prevalência da doença diminuiu e a transmissão vetorial foi interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e na maior parte do Brasil em 2000. Apesar disso, a transmissão oral fez com que a frequência de casos aumentasse em regiões como a Bacia Amazônica (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 4 - Distribuição geográfica de casos da Doença de Chagas pelo mundo



.Fonte: Adaptado de López-Vélez et al, 2020.

## Patogenia

A patogenia da doença de Chagas consiste, inicialmente, em uma fase aguda que pode ser assintomática ou cursar com sintomas brandos e não específicos como febre, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos, calafrios, anemia, miocardite, encefalite e

meningoencefalite. Na transmissão vetorial, ocorre um processo inflamatório no local da entrada do parasito. Quando a penetração ocorre pela pele leva a formação do chagoma de inoculação (Figura 5B) e quando se dá pela conjuntiva, leva a um inchaço bipalpebral, conhecido como sinal de Romaña (Figura 5A). Os indivíduos que são infectados pela via oral podem apresentar sintomas como náusea, vômito, diarreia, icterícia, dor abdominal e hemorragia gastrointestinal (GUARNER, 2019). Durante a fase aguda, a parasitemia é alta e tripomastigotas podem ser vistos em esfregaços de sangue fresco. Já a sorologia costuma ser negativa nesta fase. O parasito pode infectar qualquer célula nucleada incluindo miócitos, células endoteliais, neurônios, fibroblastos e adipócitos. Nessas células ocorre a replicação do parasito, com acúmulo das formas amastigotas intracelulares e infiltração de células mononucleadas como macrófagos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos (BONNEY et al, 2018; GUARNER, 2019).

Figura 5 - Figura ilustrativa dos sinais de porta de entrada do parasito na fase aguda da doença de Chagas

A



B



Legenda: (A) Quando a penetração é através da conjuntiva, leva ao aparecimento do sinal de Romaña. Fonte: REY, 2010. (B) Quando a penetração é através da pele, leva ao aparecimento do chagoma de inoculação.

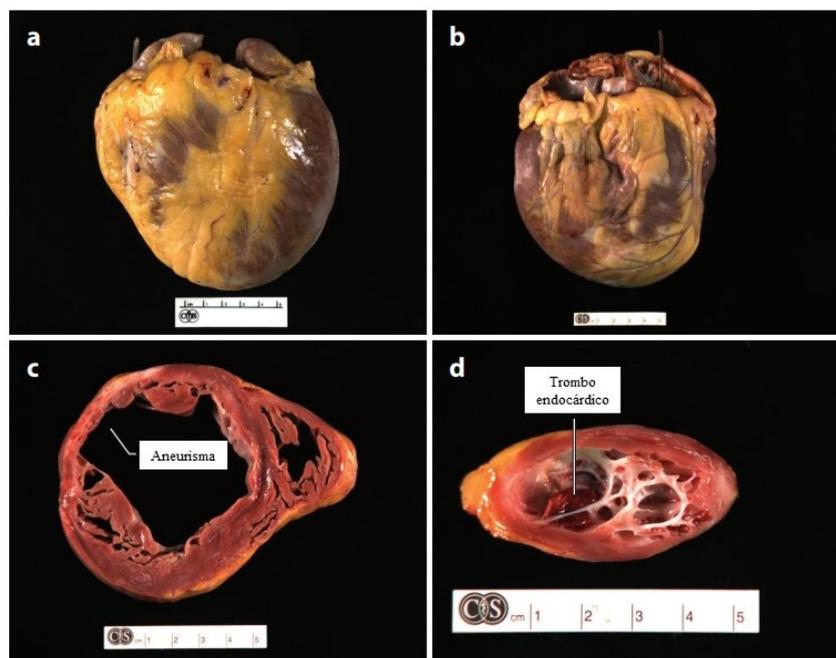
Fonte: KINOSHITA-YANAGA et al, 2009.

Após 4-8 semanas a parasitemia diminui, os sinais e sintomas desaparecem e caso os indivíduos não sejam tratados eles entram na forma indeterminada da fase crônica que cursa com sorologia positiva, ausência de manifestações clínicas, eletrocardiograma e radiografia de tórax normais, além de desenvolver uma resposta imunológica específica. (PÉREZ-MOLINA;

MOLINA, 2018). Geralmente após 10-30 anos, cerca de 20 – 30 % dos indivíduos que estão na forma indeterminada da fase crônica podem evoluir para a forma crônica sintomática cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. Muitos pacientes imunossuprimidos geralmente se tornam sintomáticos (BONNEY et al, 2018; GUARNER, 2019).

Na forma crônica cardíaca, a cardiomiopatia é uma importante manifestação clínica por conta da frequência que ela se desenvolve, sua severidade, morbidade e mortalidade. Ocorre disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, endocardite, arritmias, edema, eventos tromboembólicos, falha cardíaca terminal, fibrose intersticial e destruição de miócitos (BONNEY et al, 2018). O coração, então, fica hipertrofiado com alteração na forma e tamanho devido a intensa resposta inflamatória levando a cardiomegalia (Figura 6). Ocorre também um afinamento da parede ventricular que se projeta na forma de um aneurisma apical. A insuficiência cardíaca congestiva ocorre devido a diminuição da massa muscular que se encontra destruída devido à substituição por áreas de fibrose, à destruição do sistema nervoso simpático e parassimpático e o exsudato inflamatório (BONNEY et al, 2018; GUARNER, 2019).

Figura 6 - Figura ilustrativa destacando algumas características da cardiomiopatia chagásica



Legenda: (A, B) A cardiomegalia pode ser observada devido a intensa resposta inflamatória levando a hipertrofia do coração. (C) O afinamento da parede ventricular se projeta na forma de um aneurisma apical. (D) Um trombo endocárdico apical é visível na cavidade do aneurisma.

Fonte: Adaptado de Bonney et al, 2018.

Apesar dos parasitos serem raramente observados na análise por microscopia convencional de amostras de biópsia cardíaca nessa fase, é a sua presença persistente que parece ser fundamental em manter a miocardite crônica na doença de Chagas (BONNEY et al, 2018; GUARNER, 2019).

A forma digestiva é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais no tubo gastrointestinal como a perda do peristaltismo por conta da destruição dos gânglios autônomos caracterizando o megaesôfago e o megacólon (Figura 7). Quando o esôfago é acometido tem como sintomas a dificuldade de deglutição, dor, vômitos, disfagia, soluço, perda de peso e tosse. A intensa resposta inflamatória contribui para a destruição dos neurônios do plexo mioentérico e perda de fibras nervosas. O megacólon é caracterizado por prolongada constipação podendo dar origem ao fecaloma e isquemia intestinal. Podem ocorrer cólicas abdominais, obstrução intestinal e peritonite (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; GUARNER, 2019).

Figura 7 - Figura ilustrativa exibindo a radiologia do esôfago e cólon, representando as megasíndromes

A



B



Legenda: (A) Megaesôfago. (B) Megacólon.  
Fonte: Rassi Jr; Rassi; Rezende, 2012.

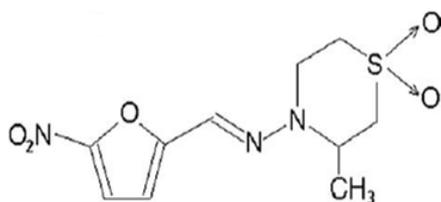
## Tratamento

O tratamento da doença de Chagas limita-se ao uso de 2 pró-fármacos nitro heterocíclicos: o benznidazol (um derivado do nitroimidazol, 2-nitroimidazol) (Figura 8B) e o

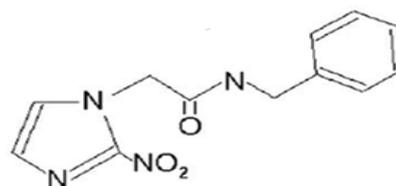
nifurtimox (um derivado do nitrofurano, 5-nitrofurano) (Figura 8A). O nifurtimox, produzido pelo laboratório Bayer, foi lançado com o nome comercial de Lampit na forma de comprimidos com 120 mg de princípio ativo. Já o benznidazol foi produzido pelo laboratório Roche até 2003 quando a partir daí os direitos e a tecnologia de fabricação foram cedidos. Atualmente, o benznidazol é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes – LAFEPE com o nome comercial de Rochagan na forma de comprimidos com 100 mg de princípio ativo (OLIVEIRA et al, 2008; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020).

Figura 8 - Estrutura química dos fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas

A



B



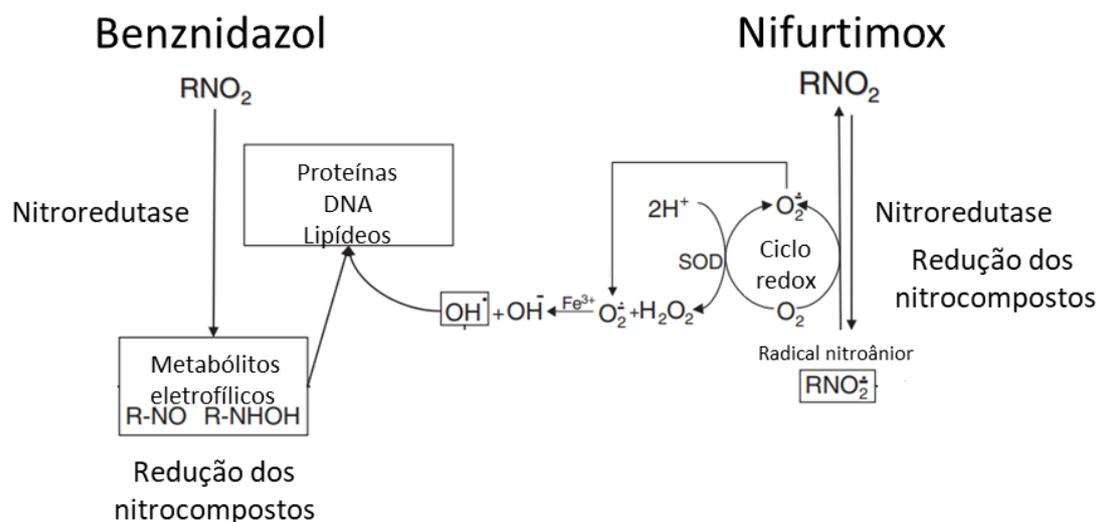
Legenda: (A) Nifurtimox. (B) Benznidazol. Fonte: Castro; Mecca; Bartel, 2006.

O esquema terapêutico para o benznidazol é feito por via oral com 5 mg/kg/dia em 1-3 doses diárias por 60 dias em adultos, e com 5 a 10 mg/kg/dia em duas doses diárias por 60 dias em crianças. Já para o nifurtimox o regime é de 10 mg/kg/dia via oral em 3 doses diárias por 60 dias em adultos e 15 mg/kg/dia em 3 doses diárias por 60 dias em crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). O tratamento é recomendado nas infecções aguda e congênita precoce, em crianças e adolescentes menores que 18 anos com infecção crônica, infecção reativada em pacientes coinfectados com HIV ou outra imunossupressão e infecções acidentais em laboratório. Ele é oferecido também para adultos com idade de 19-50 anos com a forma crônica indeterminada ou cardiomiopatia leve a moderada. Para adultos maiores que 50 anos sem cardiomiopatia avançada o tratamento é opcional. Geralmente não é oferecido para pacientes com cardiomiopatia avançada e pacientes com megaesôfago com impedimento significativo na deglutição. O tratamento é contraindicado para mulheres grávidas e pacientes com insuficiência hepática ou renal severa. Devido ao longo período de terapia com esses

fármacos, muitos pacientes abandonam o tratamento levando a falha terapêutica (OLIVEIRA et al, 2008; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020).

Como mecanismo de ação, tanto o nifurtimox quanto o benznidazol são pró-fármacos e precisam ser ativados por nitroreduzases presentes no *Trypanosoma cruzi* para exercer seu efeito citotóxico. No nifurtimox ocorre a redução do grupo nitro formando um radical nitroânion ( $R-NO_2^-$ ), catalisado por uma NADPH nitroreduzase. Esse radical participa de um ciclo redox com o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que através da reação catalisada pela enzima superóxido dismutase forma peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O peróxido de hidrogênio, na presença de  $Fe^{3+}$ , forma o radical livre hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) através da reação de Fenton. O aumento na formação dessas espécies reativas de oxigênio gera estresse oxidativo ocasionando peroxidação lipídica, alterações de membrana, inativação enzimática, degradação de DNA e mutagênese, comprometendo a vida do parasito (DOCAMPO; MORENO, 1984; MAYA et al, 2007; BOIANI et al, 2010; SPECKER et al, 2022). Já o benznidazol envolve a redução do grupo nitro inibindo as funções das proteínas, lipídeos e DNA devido à ligação covalente entre essas macromoléculas e os metabólitos reduzidos derivados do benznidazol formados (Figura 9) (DOCAMPO; MORENO, 1984; MAYA et al, 2007; KRATZ et al, 2018; MAZZETI et al, 2021).

Figura 9 – Figura ilustrativa exibindo o mecanismo de ação dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas: benznidazol e nifurtimox



Legenda: Esses fármacos são ativados por nitroreduzases para exercer seu efeito citotóxico no parasito.  
Fonte: Adaptado de Maya et al, 2007.

Esses fármacos usados no tratamento da doença de Chagas possuem uma série de efeitos colaterais. O nifurtimox pode causar anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência, insônia, desorientação, neuropatia periférica, náuseas, vômito, diarreia. Já o benznidazol pode causar hipersensibilidade principalmente sob forma de *rash cutâneo*, anorexia, intolerância gastrointestinal, problemas articulares, febre e distúrbios neurológicos, incluindo polineurite de nervos periféricos, dor de cabeça, vertigem, insônia e astenia. Como manifestações mais severas observa-se depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica, agranulocitose e polineuropatia (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020). Em função do benznidazol ser melhor tolerado que o nifurtimox e possuir melhor penetração tecidual, ele é recomendado como o tratamento de primeira escolha no Brasil. Quando ocorre falha terapêutica com o benznidazol ou intolerância aos seus efeitos colaterais, o nifurtimox é indicado para o uso (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020).

Esses fármacos são eficazes contra as formas tripomastigotas extracelulares presentes na fase aguda da infecção. O tratamento nessa fase reduz a carga parasitária, a severidade e encurta o curso clínico da doença com menor chance de passar para a fase crônica sintomática (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; LÓPEZ-VÉLEZ et al, 2020). A cura da infecção na fase aguda vai de 50% a 80% enquanto que em pacientes com a infecção crônica recente assintomática a cura é de 20% a 60% (GUARNER, 2019). Já a eficácia sobre as formas amastigotas intracelulares que estão presentes principalmente na fase crônica da doença é baixa, o que permite a persistência da infecção. A limitada penetração tecidual dos fármacos faz com que a ação dos mesmos seja insatisfatória sobre a forma amastigota, a qual é majoritária nessa fase da infecção. Sendo assim, o tratamento de pacientes que estão na fase indeterminada mais tardia ou sintomática da fase crônica tem baixa eficácia já que não ocorre cura parasitológica dos pacientes tratados (URBINA, 2014; BONNEY et al, 2018; JESUS et al, 2021). Outro fator que contribui para a falha no tratamento é que existem cepas resistentes a esses fármacos (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021). Como muitas vezes o diagnóstico da infecção ocorre já na fase crônica, tendo em vista que a fase aguda muitas vezes é assintomática ou com sintomatologia inespecífica, o tratamento da doença de Chagas torna-se insatisfatório (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2017). Sendo assim, a pesquisa por novas alternativas de tratamento que tenham menos efeitos colaterais e atuem nas formas intracelulares persistentes do parasito principalmente na fase crônica da doença se torna necessária.

## Estudos de novas alternativas de tratamento

Em busca de novas alternativas de tratamento para a doença de Chagas, estudos tem sido incentivados através do DNDi para avaliação de novos regimes de tratamento com o uso de fármacos já existentes no mercado, assim como de novas moléculas em estudo (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES, 2021). Foram elaboradas as características ideais que um produto final deve possuir para ser um novo candidato para o tratamento que são: a) eliminar todos os parasitos, tanto aqueles presentes no sangue quanto nos tecidos; b) ter atividade sobre cepas de distintas DTUs inclusive aquelas resistentes aos fármacos utilizados atualmente no tratamento; c) deve atuar nas fases aguda e crônica; d) o regime de tratamento deve ser seguro e bem tolerado para todas as idades inclusive na gravidez e amamentação; e) deve ter baixa probabilidade de interação com outros fármacos; f) deve possuir superioridade ao benznidazol no tratamento da fase aguda e crônica da doença; g) a segurança deve ser superior ao benznidazol e nifurtimox; h) não deve ser genotóxico nem teratogênico; i) não deve possuir potencial de causar arritmias; j) a apresentação deve ser oral; l) a estabilidade deve ser de 5 anos e m) o regime de dose deve ser 1 vez ao dia por 30 dias (KRATZ, 2019; GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021).

Novos estudos ligados ao DNDi têm sido conduzidos com o benznidazol com vistas a melhorar sua eficácia e tolerância. No estudo chamado BENEFIT (**B**enznidazole **E**valuation for **I**nterrupting Trypanosomiasis) pacientes de 18-75 anos, com cardiomiopatia chagásica, receberam uma dose fixa de 300 mg por dia em uma duração de terapia de 40-80 dias. Foi mostrado que o tratamento reduziu a detecção dos parasitos circulantes, apesar de não reduzir a progressão clínica cardíaca (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021).

Em outro estudo denominado CHAGASAZOL, foi comparado o uso do posaconazol, um antifúngico triazólico, em dose alta e baixa com o benznidazol, em pacientes com a forma crônica da doença de Chagas. Houve maior porcentagem de falha terapêutica nos pacientes tratados com posaconazol comparado aos pacientes tratados com benznidazol, apesar do antifúngico ter mostrado uma boa atividade em modelos murinos de fase aguda e crônica (MOLINA et al, 2014).

A combinação de fármacos também tem sido objeto de estudo para melhorar a eficácia do tratamento da doença de Chagas. Em um dos estudos, foi avaliado o efeito do tratamento combinado de benznidazol com o alopurinol, que é um medicamento usado para reduzir os níveis de ácido úrico. Em modelos murinos de infecção de fase aguda e crônica, foi

observado que a combinação permitiu o uso do benznidazol em doses baixas reduzindo os níveis de parasitemia no sangue e tecidos. O tratamento também reduziu inflamação e fibrose cardíaca, tanto na fase aguda quanto na crônica da doença (GROSSO et al, 2013). Em outro estudo o voriconazol, um antifúngico triazólico de segunda geração, foi associado ao benznidazol no tratamento *in vitro* de células vero infectadas com o *T. cruzi* e no tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c em fase aguda da infecção. O tratamento combinado teve um efeito maior em inibir a multiplicação de amastigotas intracelulares *in vitro* comparado com o tratamento isolado com benznidazol, e apesar de não ter sido observado um efeito maior no grupo que recebeu o tratamento combinado com o que recebeu somente o benznidazol quando foi avaliada a parasitemia de fase aguda *in vivo*, houve 100% de sobrevivência dos camundongos no tratamento combinado (GULIN et al, 2020).

Pelo fato de que o processo de introduzir um novo fármaco no mercado é caro e lento, estratégias de reposicionamento de fármacos já usados para outros fins terapêuticos tem sido objeto de vários estudos para o tratamento de doenças negligenciadas, como a doença de Chagas, com vistas a reduzir custos e tempo (CORREA; COSTA-SILVA; TEMPONE, 2021; MAZZETI et al, 2021). Em um estudo com a sertralina, um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, foi mostrada atividade *in vitro* sobre todas as formas evolutivas do *T. cruzi* de diferentes DTUs e nas formas tripomastigotas despolarizou o potencial de membrana mitocondrial além de reduzir a síntese de ATP (FERREIRA et al, 2018). Em outro estudo, foi avaliada a atividade da manipidina, um anti-hipertensivo bloqueador de canais de  $Ca^{++}$ , sobre o *T. cruzi* em que se observou citotoxicidade *in vitro* para tripomastigotas metacíclicos e amastigotas intracelulares melhor que o benznidazol. Em tripomastigotas a manipidina induziu despolarização do potencial de membrana plasmático e mitocondrial, aumento de ROS e diminuição dos níveis de ATP (CORREA; COSTA-SILVA; TEMPONE, 2021). Já estudos com a memantina, fármaco usado no tratamento do Alzheimer, afetou, *in vitro*, o crescimento das formas epimastigotas, levou a exposição de fosfatidilserina, aumento na produção de  $H_2O_2$ , aumento da concentração intracelular de  $Ca^{++}$ , diminuição dos níveis de ATP e alterações morfológicas como encolhimento celular. Em tripomastigotas, a memantina diminuiu a metaciclogênese e interferiu com a infectividade do parasito, diminuindo a quantidade de tripomastigotas liberados das células lisadas (DAMASCENO et al, 2014).

O Fexinidazol, um derivado do 5-nitroimidazol atualmente usado para tratar a doença do sono, mostrou alta eficácia na cura parasitológica de camundongos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas causada por cepas sensíveis, parcialmente ou totalmente resistentes ao benznidazol, além de mostrar um perfil toxicológico e farmacológico favorável

(GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021). O fármaco foi utilizado em estudos de Fase II em adultos com a doença de Chagas na fase crônica indeterminada no qual os pacientes receberam 2 doses de fexinidazol (1200 e 1800 mg) por 2, 4 e 8 semanas comparado com pacientes que receberam placebo. O tratamento teve alta eficácia no tratamento da parasitemia dos adultos na fase crônica indeterminada até na menor dose empregada, de 1200 mg/dia via oral, com resposta em menos de 3 dias e os efeitos colaterais foram observados somente com altas doses administradas e por mais de 14 dias de tratamento. Outros estudos são necessários para avaliar a mínima dose efetiva, através de investigações de segurança e o balanço risco-benefício (TORRICO et al, 2022).

Benzoxaboroles, uma nova classe de moléculas contendo boro, também foram utilizadas em estudos *in vivo* com o *T. cruzi*. Essas moléculas são pró-drogas ativadas por uma enzima do parasito, a serina carboxipeptidase. Elas promoveram 100 % de cura de camundongos infectados com parasitos de diferentes DTUs, além da cura de primatas não humanos em fase crônica, apresentando também segurança nos estudos toxicológico, farmacológico e de genotoxicidade (PADILLA et al, 2022).

Estudos com produtos naturais derivados de plantas também têm sido conduzidos contra o *T. cruzi*. Várias classes de metabólitos secundários de plantas, tais como sesquiterpenos, chalconas, flavonóides, coumarinas, taninos, terpenóides, diterpenóides, triterpenos, saponinas, quinonas e alcalóides já demonstraram alguma atividade antiparasitária obtendo *in vitro* contra epimastigotas e tripomastigotas do parasito (SALEM; WERBOVETZ, 2006; MAZZETI et al, 2021).

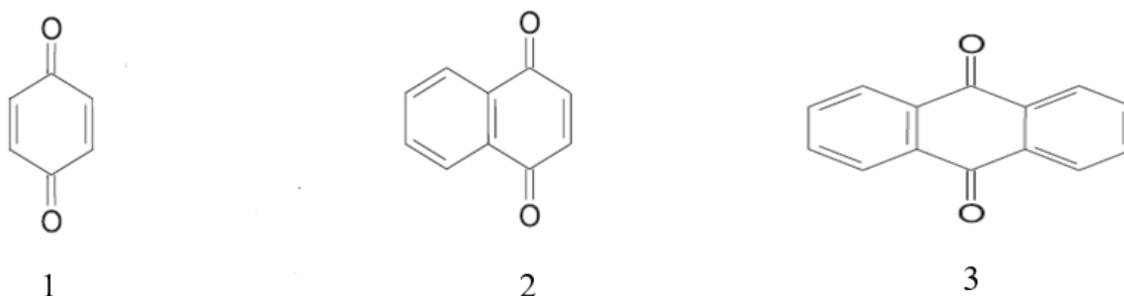
Apesar de esforços na busca por novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas, não existem avanços em relação ao tratamento atual, inclusive sobre a fase crônica da doença que ainda carece de um fármaco com atividade satisfatória.

### **Quinonas, Lapachol e Pterocarpanoquinona LQB-118**

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural, estando envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida dos seres vivos como a fotossíntese. Com base na sua estrutura molecular, elas são divididas em diferentes grupos de acordo com o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas (um

anel benzênico), naftoquinonas (um anel naftalênico) e antraquinonas (um anel antracênico linear ou angular) (Figura 10) (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Figura 10 - Classificação das quinonas



Legenda: 1 – Benzoquinona; 2 – Naftoquinona; 3 – Antraquinona.  
 Fonte: Adaptado de Silva; Ferreira; Souza, 2003.

Naftoquinonas são metabólitos amplamente distribuídos no reino vegetal. Sua estrutura molecular permite essas moléculas possuírem propriedades redox que podem interferir em processos biológicos oxidativos (MENNA-BARRETO et al, 2005). As naftoquinonas dividem uma similaridade estrutural no anel quinonoídico com a ubiquinona, a qual possui um papel fundamental na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial já que a ubiquinona funciona como um carreador móvel de elétrons dentro do sistema de transporte de elétrons importante para a fosforilação oxidativa. As naftoquinonas, então, por participar do ciclo redox podem interagir com a cadeia respiratória permitindo a geração de radicais livres que pode ser deletério para parasitos. Essas moléculas também possuem atividade inibidora de topoisomerases e alquilação com ácidos nucleicos (SALEM; WERBOVETZ, 2006; NELSON; COX, 2019; BARBOSA et al, 2021).

O lapachol e  $\beta$  lapachona são naftoquinonas bioativas isoladas de plantas da família Bignoniaceae, Verbanaceae e Proteaceae, as quais são abundantes em florestas tropicais, sendo de maior ocorrência na família Bignoniaceae principalmente no gênero *Tabebuia sp*, árvores conhecidas como “ipês”, sendo de fácil extração da serragem da madeira dessas árvores. Várias atividades farmacológicas foram atribuídas ao lapachol, tais como atividade antimicrobiana e antifúngica, atividade cercaricida, moluscicida, leishmanicida,

tripanossomicida, antimalárico, antiviral, antiinflamatória, antineoplásica e antiulcerante (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; MENNA-BARRETO et al, 2005; BOMBAÇA et al, 2021).

O  $\beta$  lapachol e seus derivados mostraram atividade sobre o *Trypanosoma cruzi*, inibindo o crescimento das formas epimastigotas e diminuindo a viabilidade de tripomastigotas metacíclicos (SALAS et al, 2008). Outro estudo mostrou que a molécula R72, outro derivado do  $\beta$  lapachol, promoveu alterações estruturais em epimastigotas como cinetoplasto largo e o perfil do DNA mitocondrial alterado, formação de ROS, fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina e formação de autofagossomos (DOS ANJOS et al, 2016). Naftoimidazóis derivados do  $\beta$  lapachol mostraram atividade sobre epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*, com alterações morfológicas como retração e torção do corpo celular, formação de bolhas na membrana flagelar, inchaço mitocondrial, presença de estruturas de membrana concêntricas e epimastigotas com 2 cinetoplastos ou 2 núcleos. A mitocôndria do parasito foi o principal alvo dessas moléculas onde houve diminuição do consumo de oxigênio, diminuição da atividade de complexos mitocondriais, diminuição de ATP, perda do potencial de membrana mitocondrial e formação de  $H_2O_2$  (BOMBAÇA et al, 2021).

Como mecanismo de ação proposto, naftoquinonas como o  $\beta$  lapachol são reduzidos devido ao seu alto potencial redox na mitocôndria, gerando o radical semiquinona que por sua vez reduz o oxigênio molecular ao ânion superóxido que na presença da enzima superóxido dismutase é transformado em peróxido de hidrogênio. O ânion superóxido por catálise com metais de transição ou por reação com peróxido de hidrogênio gera  $OH^-$  no interior da célula. Essas espécies reativas de oxigênio formadas (radical hidroxila e peróxido de hidrogênio) são as responsáveis pelo estresse oxidativo celular, levando à peroxidação lipídica, destruição de proteínas e danos ao DNA. O radical semiquinona também pode se ligar covalentemente a ácidos nucleicos e proteínas (SALAS et al, 2008; BOMBAÇA et al, 2021).

Pterocarpanos são isoflavonóides isolados principalmente de leguminosas frequentemente usados na medicina popular como terapia alternativa. Essas moléculas possuem um anel tetracíclico com benzofurano-benzopirano, sendo sintetizados por plantas quando submetidas a algum tipo de estresse como patógenos, radiação UV e sais de metais pesados (GOEL; KUMAR; RAGHUVANSHI, 2012; SELVAM et al, 2017). Várias ações farmacológicas foram relatadas a essa classe de compostos como atividade antitumoral em linhagens celulares sensíveis e com perfil de multi resistência a fármacos, antioxidante,

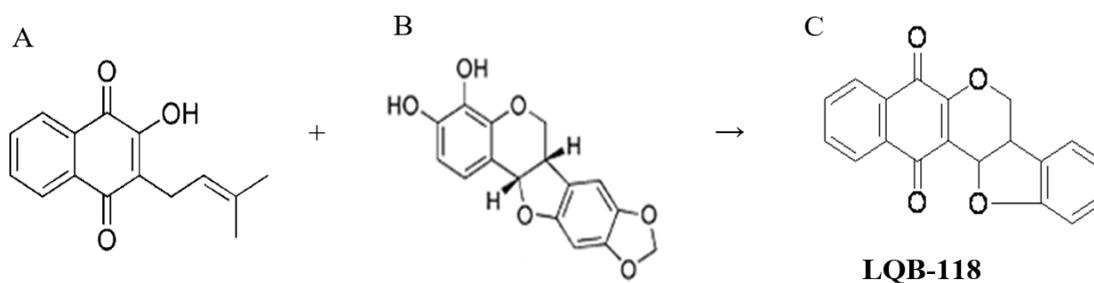
antimalárica, antibacteriana, antifúngica, antidiabética e antiosteoporose (SELVAM *et al*, 2017).

Pterocarpanos foram estudados *in vitro* sobre promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. O Pterocarpano extraído da espécie *Connarus suberosus* inibiu a multiplicação em ambas as espécies de *Leishmania in vitro* e na avaliação do mecanismo de ação em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, a integridade da membrana plasmática foi afetada, houve aumento de corpos lipídicos e despolarização do potencial de membrana, sugestivo de disfunção mitocondrial (MORAIS *et al*, 2020).

Estudos também foram realizados sobre o *Trypanosoma cruzi* e pterocarpanos isolados de várias plantas da região da caatinga inibiram o crescimento, *in vitro*, das formas epimastigotas (VIEIRA *et al*, 2008).

Levando em consideração o potencial farmacológico do lapachol e pterocarpanos, foi sintetizada uma molécula híbrida denominada pterocarpanoquinona LQB-118 (Figura 11), com objetivo de avaliar seu potencial terapêutico (MAIA *et al*, 2011; CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2011; DE SÁ BACELAR *et al*, 2013).

Figura 11 – Síntese da pterocarpanoquinona LQB-118



Legenda: (A) – Lapachol; (B) – Pterocarpano; (C) – Pterocarpanoquinona LQB-118 sintetizada através de hibridização molecular.

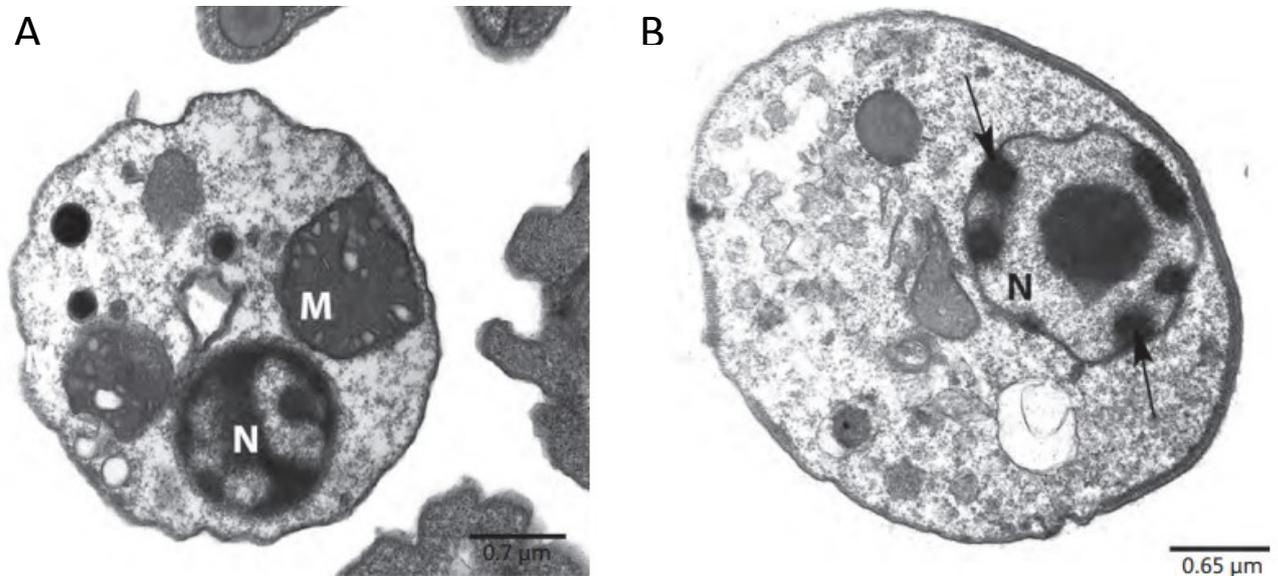
Fonte: Adaptado de Cunha-Júnior *et al*, 2011; Salustiano *et al*, 2009.

Vários estudos foram conduzidos com a LQB-118 com o objetivo de avaliar seu potencial antitumoral e antiparasitário. A LQB-118 exibiu atividade sobre células de pacientes com leucemia mielóide crônica (LCM) tanto sensíveis quanto com perfil de multi resistência a fármacos induzindo apoptose com aumento na externalização de fosfatidilserina (MAIA *et al*,

2011). A molécula também mostrou atividade contra diferentes células leucêmicas sensíveis e resistentes ao estresse oxidativo com ativação de caspases, fragmentação de DNA, aumento dos níveis intracelulares de cálcio em ambas as células e despolarização do potencial de membrana nas células LCM sensíveis ao estresse oxidativo (DE SÁ BACELAR et al, 2013). Um dos mecanismos de ação propostos em células tumorais é que a LQB-118 sofreria a redução por 2 elétrons pela enzima mitocondrial NAD(P)H quinona oxidoreductase-1, formando hidroquinona que funciona como agente alquilante de DNA. O outro mecanismo seria a redução por 1 elétron por redutases do citocromo P450 ao radical semiquinona e esta através do ciclo redox reduziria o oxigênio molecular ao ânion superóxido iniciando a cascata de eventos que leva ao estresse oxidativo (NETTO et al, 2010; MAIA et al, 2011; DE SÁ BACELAR et al, 2013). O tratamento *in vivo* com a LQB-118 em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich diminuiu a viabilidade das células tumorais exibindo um perfil apoptótico, além de não haver ganho de peso nos animais tratados. Já camundongos C57BL/6 com o melanoma B16F10 e tratados, tiveram redução do crescimento tumoral e melhora na caquexia comparado aos animais não tratados (SALUSTIANO et al, 2016). A LQB-118 também foi ativa em células de câncer de próstata, exibindo citotoxicidade *in vitro* com efeitos antiproliferativos e indução de apoptose sendo também mostrada a correlação direta entre a redução da sua porção quinona com sua ativação e o aumento na formação de ROS pelas células tumorais. *In vivo*, animais com o tumor e tratados tiveram o tumor reduzido (MARTINO et al, 2014; MARTINO et al, 2019). Nas células de pacientes com glioblastoma, a LQB-118 reduziu, *in vitro*, a viabilidade celular quando o tratamento foi combinado ou não com radiação (BERNARDO et al, 2020).

A LQB-118 também foi avaliada sobre a sua atividade antiparasitária. Em *Toxoplasma gondii*, a molécula diminuiu o índice de infecção em células LLC-MK2, *in vitro*, causando alterações morfológicas no parasito como arredondamento e encolhimento celular além de aumentar a percentagem de conversão de taquizoítas em bradizoítas (PORTES et al, 2012). Já em *Leishmania amazonensis* a molécula diminuiu a viabilidade de promastigotas *in vitro*, induziu a formação de ROS, provocou alterações estruturais como arredondamento celular, inchaço da mitocôndria, condensação da cromatina nuclear (Figura 12), causou despolarização do potencial de membrana mitocondrial, diminuição na produção de ATP e fragmentação de DNA tanto das formas promastigotas quanto das amastigotas intracelulares (RIBEIRO et al, 2013).

Figura 12 – Alterações morfológicas em *Leishmania amazonensis* causadas pelo tratamento com a LQB-118



Legenda: (A) – Arredondamento celular e inchaço da mitocôndria (B) - Condensação da cromatina nuclear (seta). N - núcleo, M – mitocôndria

Fonte: Adaptado de Ribeiro et al, 2013.

Nosso grupo demonstrou a atividade da LQB-118 em *Leishmania braziliensis*, tanto *in vivo* em hamsters infectados quanto *in vitro* sobre o parasito. A molécula inibiu o crescimento das promastigotas e das amastigotas intracelulares sem alteração na produção de óxido nítrico pelos macrófagos. As promastigotas apresentaram exposição de fosfatidilserina, aumento de ROS e diminuição na formação de ATP. O tratamento de hamsters infectados diminuiu o tamanho da lesão e a carga parasitária (COSTA et al, 2014). A molécula também mostrou atividade sobre *Leishmania infantum in vitro*, inibindo o crescimento de promastigotas e diminuindo o índice de infecção de macrófagos infectados e *in vivo*, onde o tratamento de camundongos infectados inibiu hepato e esplenomegalia e reduziu a carga parasitária (CUNHA-JÚNIOR et al, 2016).

Devido ao espectro de ação antitumoral e antiparasitário da LQB-118, nosso grupo iniciou um estudo da molécula sobre o *Trypanosoma cruzi*. A molécula mostrou atividade, *in vitro*, diminuindo o índice de infecção de macrófagos infectados com o parasito, além de diminuir a viabilidade de tripomastigotas metacíclicos e inibir o crescimento de epimastigotas. Ela também resultou na fragmentação do DNA das amastigotas intracelulares e induziu alterações celulares como arredondamento e encolhimento celular em epimastigotas

(AZEVEDO, 2013). Em experimentos com camundongos infectados, a LQB-118 também diminuiu a parasitemia durante a fase aguda, além de reduzir a deposição de colágeno no início da fase crônica da infecção (BRITO, 2020). Visto que a molécula possui atividade sobre o parasito, estudos são necessários para avaliar qual o mecanismo da LQB-118 sobre o *T. cruzi*.

## **Mitocôndria**

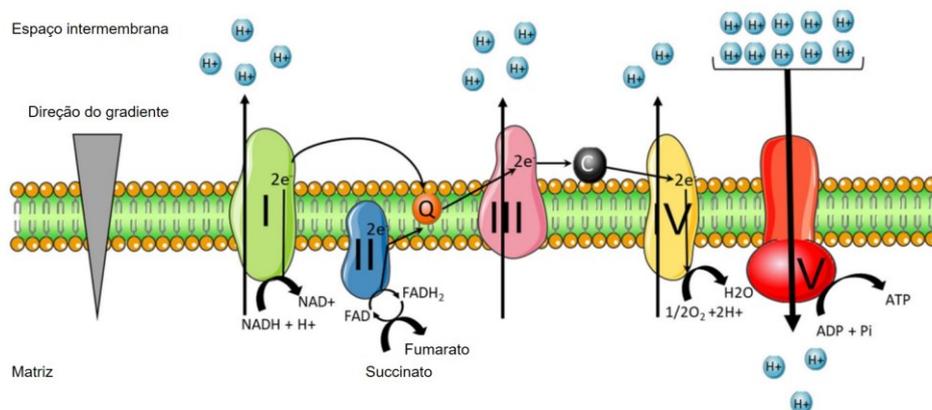
As mitocôndrias são organelas que exercem um papel importante no controle do ciclo celular, proliferação, e apoptose. Como papel bioenergético, ela é o sítio da produção de ATP das células através da fosforilação oxidativa que é essencial para sobrevivência, crescimento e reprodução de organismos eucariotos, incluindo parasitos (MONZOTE; GILLE, 2010; MARTINS et al, 2020). A sua integridade funcional é essencial e a disfunção da mesma pode levar à morte celular (MARTINS et al, 2020).

A organela possui uma estrutura típica composta por duas membranas, uma membrana externa e uma membrana interna que forma invaginações conhecidas como cristas sendo impermeável a moléculas e íons e o transporte através dessa membrana é regulado por proteínas transportadoras específicas. É na membrana interna que se encontram os complexos componentes do sistema de transporte de elétrons. A matriz mitocondrial contém as enzimas do ciclo de Krebs e do catabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, além de ATP, ADP, fosfato inorgânico e alguns íons (MONZOTE; GILLE, 2010; GALLUZZI et al, 2012; BLIEK; SEDENSKY; MORGAN, 2017).

A fosforilação oxidativa é um dos mecanismos responsáveis pela produção de ATP em organismos eucariotos, exercendo um importante papel no metabolismo energético (NELSON; COX, 2019; FERNANDEZ-VIZARRA; ZEVIANI, 2021). Ela é um processo acoplado ao sistema de transporte de elétrons o qual, em mamíferos, é composto por 4 complexos enzimáticos na membrana interna: NADH:ubiquinona oxidoreductase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), ubiquinona:citocromo c oxidoreductase (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV), além da ATP sintase (Figura 13). A ubiquinona e o citocromo c funcionam como carreadores móveis de elétrons (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009; TOMÁS; CASTRO, 2013). Elétrons coletados por desidrogenases através das vias catabólicas são canalizados para aceptores universais de elétrons ( $\text{NAD}^+$  ou

FAD) que funcionam como doadores primários de elétrons no sistema de transporte de elétrons. Além deles, succinato também pode funcionar como doador primário. Através de um sistema de reações de oxirredução, ocorre a transferência de elétrons entre esses doadores primários para o conjunto de complexos até chegarem ao oxigênio o qual é o aceptor final de elétrons. A energia de transferência de elétrons é usada para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana pelos complexos I, III e IV gerando um gradiente eletroquímico de prótons que provê a energia necessária, a força próton motriz, para gerar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico, quando esses prótons retornam a matriz mitocondrial através da ATP sintase (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008; BLIEK; SEDENSKY; MORGAN, 2017; GUAN; ZHAO; PENG, 2022).

Figura 13 – Figura ilustrativa do sistema de transporte de elétrons exibindo os 4 complexos enzimáticos por onde ocorre o transporte de elétrons até chegar no oxigênio o qual é o aceptor final de elétrons complexo



Legenda: I – NADH: ubiquinona oxidoreductase; complexo II – succinato desidrogenase; complexo III – ubiquinona:citocromo c oxidoreductase; complexo IV - citocromo c oxidase e ATP sintase.

Fonte: Adaptado de Andrieux et al, 2021.

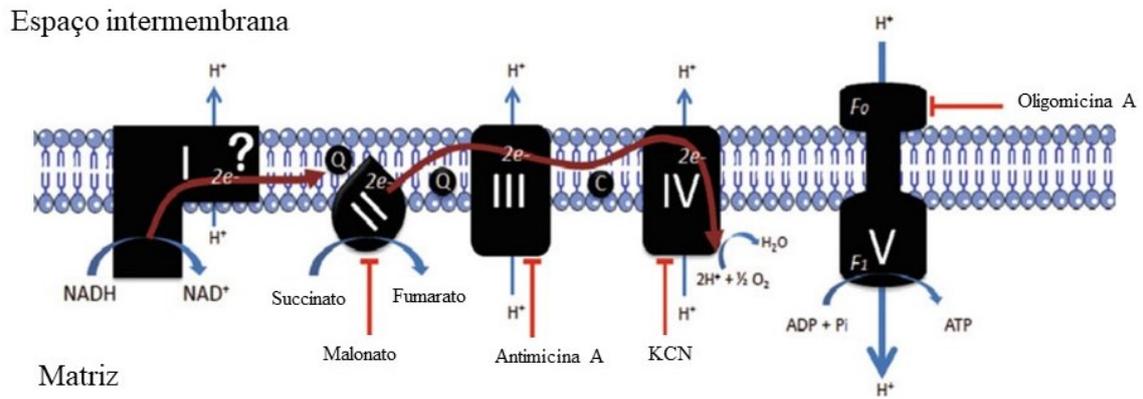
As mitocôndrias também são consideradas os maiores sítios de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e o status redox do sistema de transporte de elétrons mitocondrial é crucial na formação dessas espécies (BOVERIS; CHANCE, 1973; NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Durante o metabolismo oxidativo, uma pequena parte do oxigênio que é consumido pela mitocôndria é parcialmente reduzido, permitindo a formação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que por sua vez pode ser convertido a peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) através da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio caso não seja hidrolisado por peroxidases pode, na presença de metais como o Fe<sup>+2</sup> ou Cu<sup>+2</sup>, formar o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) (MANDAVILLI; SANTOS; HOUTEN, 2002; PAES et al, 2011; TOMÁS; CASTRO, 2013). Essas espécies reativas de oxigênio, especialmente o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila podem causar lesões no DNA, além de levar à perda de função de proteínas, lipídios e carboidratos (MARTINS et al, 2020). Se essas espécies reativas de oxigênio, derivadas do vazamento de elétrons no metabolismo energético mitocondrial, exceder a capacidade antioxidante da organela, forma-se o estresse oxidativo que é prejudicial à célula, já que o mesmo pode levar à perda da função das macromoléculas (PELOSO et al, 2012; TOMÁS; CASTRO, 2013). O *Trypanosoma cruzi* por ter um ciclo que se alterna entre hospedeiros invertebrado/vertebrado e com o objetivo de assegurar sua sobrevivência e adaptação a diferentes ambientes, precisa lidar com ROS produzidas por seu hospedeiro e geradas pelo seu próprio metabolismo e assim possui uma homeostase redox eficientemente regulada (PELOSO et al, 2012; MARTINS et al, 2020).

Através de estudos com o heme, produto da digestão da hemoglobina, sobre o *T. cruzi*, foi observado que a molécula é capaz de promover a proliferação das formas epimastigotas (NOGUEIRA et al, 2015). Esse efeito foi correlacionado com a produção de ROS induzida por heme mostrando que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas nos processos metabólicos do parasito (NOGUEIRA et al, 2017).

Protozoários como o *Trypanosoma cruzi* pertencentes a família Trypanosomatidae possuem a peculiaridade de ter somente uma mitocôndria e a sobrevivência da célula depende da funcionalidade da organela, o que torna essa mitocôndria um alvo interessante para a pesquisa de moléculas com atividade tripanossomicida. No parasito, essa única mitocôndria pode ocupar 12 % do volume celular sendo associada ao cinetoplasto, estrutura que contém o DNA extranuclear. Outra peculiaridade é que o complexo I do *T. cruzi* é insensível a rotenona, não é funcional no bombeamento de prótons para o espaço intermembrana, além de não ser funcional na oxidação do NADH. Apesar disso, as formas epimastigotas utilizam o succinato como substrato principal transferindo elétrons para o complexo II para chegar ao acceptor final, o oxigênio (CARRANZA et al, 2009; GONÇALVES et al, 2011; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

Figura 14 – Sistema de transporte de elétrons do *T. cruzi* exibindo os complexos enzimáticos por onde ocorre o transporte de elétrons



Legenda: O complexo I, apesar de existente, não é funcional.  
 Fonte: Adaptado de Alencar; Girard; Silber, 2020.

## 1 JUSTIFICATIVA

Devido a limitação dos medicamentos usados atualmente para tratar a doença de Chagas, a pesquisa por novos fármacos que tenham menos efeitos adversos e maior eficácia, sobretudo na fase crônica da doença se faz necessária.

Em razão da mitocôndria dos tripanosomatídeos possuir peculiaridades que a diferencia das mitocôndrias de mamíferos, essa organela se torna um alvo farmacológico interessante para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a pterocarpanoquinona LQB-118 apresentou efeito tóxico sobre o *T. cruzi*. A LQB-118 diminuiu a motilidade de tripomastigotas metacíclicos, inibiu o crescimento de epimastigotas e amastigotas intracelulares, além de fragmentar o DNA das amastigotas (dados não publicados). Os valores de IC<sub>50</sub> da LQB-118 sobre as principais formas evolutivas e CC<sub>50</sub> sobre macrófagos peritoneais é mostrado abaixo conforme dados obtidos (AZEVEDO, 2013).

Tabela 1 - Valores de IC<sub>50</sub> da LQB-118 sobre as principais formas evolutivas do *T. cruzi*.

<b>IC<sub>50</sub> da LQB-118</b>	
<b>Forma evolutiva</b>	<b>Valor</b>
Epimastigota	2,5 µM em 96 horas
Tripomastigota metacíclico	40 µM em 48 horas
Amastigota intracelular	4,2 µM em 72 horas
<b>CC<sub>50</sub> da LQB-118</b>	
Macrófagos peritoneais	40 µM em 72 horas

O fato da LQB-118 apresentar ação antiparasitária em *Leishmania sp* envolvendo como alvo a mitocôndria, nos permite supor a ação tóxica sobre outro tripanosomatídeo, como o *T. cruzi*, podendo também envolver essa organela.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a ação antiparasitária da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o *Trypanosoma cruzi* e delinear seu mecanismo de ação, tendo como alvo a mitocôndria do parasito.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar se a LQB-118 interfere na capacidade de epimastigotas realizarem a metaciclologênese induzida *in vitro*;
- b) Analisar se o tratamento de formas tripomastigotas com a LQB-118 é capaz de alterar a sua capacidade infectante para macrófagos;
- c) Averiguar se o tratamento do parasito com a LQB-118 induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- d) Investigar a interferência da LQB-118 na fisiologia mitocondrial do parasito por meio da análise do consumo de O<sub>2</sub> e produção de ATP;
- e) Pesquisar alterações na ultraestrutura de parasitos tratados com a LQB-118 que possam corroborar com os dados acerca da funcionalidade mitocondrial e de morte celular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Pterocarpanoquinona LQB-118

A síntese da pterocarpanoquinona LQB-118 foi realizada pelo grupo do Professor Paulo Roberto Ribeiro Costa do Laboratório de Química Biorgânica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A molécula foi solubilizada em DMSO (Sigma-Aldrich) para a preparação da solução estoque na concentração de 460 mM, a partir da qual foram feitas diluições em meios de cultivo para uso nos experimentos. A concentração final de DMSO nas culturas não ultrapassou 0,02%.

#### 3.2 Parasito, cultivo e manutenção de epimastigotas

Neste trabalho foi utilizado o clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi* (CONTRERAS et al, 1985), DTU I. Este clone foi gentilmente cedido pelo grupo da profa. Marcia C. Paes do Laboratório de Interação de Tripanosomatídeos e Vetores (LITV), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidos por repiques semanais em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 5 ml de meio BHI (Brain-heart-infusion) (BactoBecton, Dickinson and Company) suplementado com 30 µM Hemina (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab) e cultivados em estufa a 27° C.

#### 3.3 Obtenção de tripomastigotas metacíclicos *in vitro*

Para obtenção de tripomastigotas metacíclicos foi feito o procedimento de metaciclogênese *in vitro* induzindo a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. Para isto utilizou-se os meios artificiais TAU (Urina Artificial de Triatomíneo composto por tampão fosfato de sódio 0,2 M, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de

magnésio, cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio) e TAU3AAG (Urina Artificial de Triatomíneo suplementado com prolina, glutamato, aspartato e glicose) que são meios de cultura pobres em nutrientes que mimetizam a urina do triatomíneo e assim submetendo epimastigotas a um estresse nutricional, eles se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (CONTRERAS et al, 1988). Epimastigotas do clone Dm28c de *T. cruzi* cultivados como descrito no item 3.2 foram obtidos após 7 dias de cultivo em BHI, centrifugados a 2.500 g por 10 minutos, lavados e submetidos ao meio TAU por 2 horas em estufa a 27° C na concentração de  $5 \times 10^8$  células/ml. Após esse tempo as células foram incubadas em meio TAU3AAG na concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml a 27° C por 4 dias (adaptação de CONTRERAS et al, 1985). Obtivemos, com este procedimento, cerca de 70-85% de formas tripomastigotas metacíclicas.

### 3.4 Atividade da LQB-118 sobre a metaciclogênese

Com o objetivo de verificar se a LQB-118 seria capaz de interferir na capacidade de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas, o processo de metaciclogênese foi induzido *in vitro*, como descrito no item 3.3, sob o tratamento da LQB-118. As formas epimastigotas foram submetidas ao meio TAU/TAU3AAG na presença de 2,5 ou 5  $\mu$ M da LQB-118. O controle foi parasitos submetidos aos meios TAU e TAU3AAG com 0,02% DMSO na ausência da LQB-118. Após 4 dias, alíquotas de 10  $\mu$ l foram colocadas em lâminas, coradas com Panótico e foram contados em microscópio a quantidade de tripomastigotas formados diferenciando das formas epimastigotas (mínimo de 300 células por tratamento). O resultado foi expresso como % de metaciclogênese.

### 3.5 Infecção experimental e considerações éticas

Todos os procedimentos com os animais para obtenção de macrófagos 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 e CEUA/026/2022-renovação.

### 3.6 Influência da LQB-118 sobre a infectividade de tripomastigotas metacíclicos

Para avaliar se a LQB-118 seria capaz de alterar a capacidade infectante do parasito, tripomastigotas metacíclicos (obtidos por metaciclogênese *in vitro*, como descrito no item 3.3) a  $1 \times 10^7$  parasitos/ml, foram tratados com LQB-118 a 10  $\mu$ M e 40  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> tripomastigotas/48h) diluída em meio RPMI (Cultilab) acrescido de 10 % de soro fetal bovino inativado a 27<sup>o</sup> C. O controle foi o parasito cultivado somente com meio de cultura RPMI + 10 % de soro fetal bovino inativado contendo 0,02% DMSO. Após 48 horas de tratamento esses tripomastigotas foram lavados uma vez para remoção da LQB-118 e usados para infectar monocamadas de macrófagos. Para isso, os macrófagos foram extraídos por lavagem intraperitoneal de camundongos Swiss com 5 ml de meio RPMI gelado. As células a  $2 \times 10^6$  / ml foram distribuídas sobre lamínulas de vidro redondas dispostas no fundo de placas de 24 poços (500  $\mu$ l/poço) e incubadas por 24 horas a 37<sup>o</sup> C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para aderência. Após esse tempo, as células não aderentes foram removidas por aspiração do sobrenadante dos poços. Os tripomastigotas previamente tratados foram então ajustados na proporção de 5 parasitos/macrófago, ressuspensos em meio RPMI e distribuídos sobre a monocamada de macrófagos. Após 24 horas de interação a 37<sup>o</sup> C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, três lamínulas da sextuplicata de cada interação macrófagos/parasitos (controle e tratados) foram retiradas e submetidas à coloração com Panótico (Laborclin). As outras três lamínulas de cada tratamento foram lavadas com PBS a temperatura ambiente, houve a substituição das culturas por novo meio RPMI acrescido de 10 % de soro fetal bovino inativado e incubadas por mais 48 horas. Após esse período, essas culturas também foram submetidas à coloração com Panótico. Foram contados em microscópio de luz a quantidade de macrófagos infectados e não infectados (mínimo de 100 células por lamínula) assim como o número de amastigotas intracelulares por macrófago, sendo o resultado expresso como Índice de Infecção, utilizando-se a seguinte fórmula: IF = % de células infectadas X número de amastigotas / número total de macrófagos.

Adicionalmente, imagens das monocamadas de macrófagos infectados foram obtidas por microscopia de luz após 24 e 72 horas de interação.

### **3.7 Determinação de espécies reativas de oxigênio de parasitos tratados com a LQB-118**

Para avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio de parasitos tratados com a LQB-118 utilizou-se a sonda fluorescente Amplex red (ThermoFisher). A Amplex red detecta a formação de peróxido de hidrogênio que na presença de peroxidase gera o produto fluorescente resorufina, podendo essa sonda também ser convertida a resorufina através de carboxilestearases presentes na mitocôndria (MIWA et al, 2016). Epimastigotas colhidos após 7 dias de cultivo foram tratados com a LQB-118 diluída no meio de cultura BHI acrescido de 10 % de soro fetal bovino inativado, por 24 e 48 horas. Como controle foram utilizados parasitos cultivados somente com meio de cultura BHI + 10 % de soro fetal bovino inativado contendo 0,02% DMSO. Também foi utilizado um controle negativo com 2  $\mu\text{M}$  FCCP (carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi) fenil-hidrazona) para avaliar se o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem origem na mitocôndria. Para avaliar, então, a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , os parasitos foram ajustados para a concentração de  $1,5 \times 10^7$  células/ml, centrifugados a 2.500 g por 10 minutos e lavados duas vezes com PBS. O controle com FCCP foi adicionado, incubado por 30 minutos, centrifugado e lavado com PBS. Os parasitos foram então ressuspensos em 60  $\mu\text{l}$  de PBS a temperatura ambiente junto com 60  $\mu\text{l}$  de Working solution (0,1 mM de Amplex Red + 0,2 UI/ml de HRP diluídos em PBS) e incubados por 30 minutos, no escuro. Após esse tempo, as células foram centrifugadas e 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante, contendo a resorufina formada, foi adicionado em triplicata em placa de 96 poços escura. As leituras foram feitas por fluorimetria usando o Envision<sup>R</sup> 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer) com comprimentos de onda de 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculada através de uma curva padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O resultado foi expresso como concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\mu\text{M}$ .

### 3.8 Avaliação do consumo de O<sub>2</sub> através de respirometria de alta resolução

Para determinação da taxa de consumo de oxigênio de parasitos tratados com a LQB-118 foi utilizado um respirômetro de alta resolução (O2K-OROBOROS Instruments, Innsbruck, Áustria). Epimastigotas colhidos após 5 dias de cultivo foram tratados com a LQB-118 diluída no meio de cultura BHI acrescido de 10 % SBF. Parasitos cultivados somente com meio de cultura BHI + 10 % SBF contendo 0,02% DMSO foram utilizados como controle. Após a incubação por 24 e 48 horas, os parasitos foram ajustados para a concentração de  $5 \times 10^7$  células/ml, centrifugados, lavados e ressuspensos em um volume de 2 ml de BHI para análise. A temperatura foi mantida a 28° C no equipamento e a concentração e o fluxo de oxigênio foram registrados e analisados utilizando o software DatLab5 (O2K-OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Para avaliar os diferentes estados respiratórios Proton Leak, capacidade máxima respiratória (ETS) e ROX foram utilizados respectivamente 2 µg/ml de Oligomicina (Sigma-USA), até 1 µM de FCCP (Sigma-USA) e 2 µg/ml de Antimicina A (Sigma-USA). A Oligomicina inibe a ATP sintase bloqueando a síntese de ATP e assim o consumo de oxigênio é sustentado pelo Proton Leak. O FCCP desacopla a fosforilação oxidativa do sistema de transporte de elétrons induzindo o consumo de oxigênio em sua capacidade máxima. A Antimicina A inibe o complexo III do sistema de transporte de elétrons inibindo o sistema de transporte de elétrons e interrompendo a formação do gradiente de prótons e assim bloqueia o consumo de oxigênio mitocondrial distinguindo o consumo de oxigênio mitocondrial do consumo não mitocondrial remanescente (LERCHNER et al, 2019; ALENCAR; GIRARD; SILBER, 2020). A respiração fisiológica mitocondrial (Rotina), a capacidade máxima respiratória (ETS) e LEAK foram calculados pela subtração do consumo basal pelo consumo não-mitocondrial (ROX), pela subtração do consumo após a adição de FCCP pelo consumo não-mitocondrial (ROX) e pela subtração do consumo após a adição de Oligomicina pelo consumo não-mitocondrial (ROX), respectivamente. Para o cálculo da fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS), a respiração Rotina foi subtraída do LEAK. Para a correlação entre os diferentes estados respiratórios foi usada a razão de controle de fluxo (FCR), através da divisão entre OXPHOS/ETS e LEAK/ETS, que refletem respectivamente a fração da capacidade máxima respiratória usada pela fosforilação oxidativa e a fração da capacidade máxima respiratória correlacionada ao LEAK (GNAIGER, 2020). A capacidade de reserva respiratória (SCR), que reflete a aquisição adicional de energia

mitocondrial quando a mesma está sob algum estresse fisiopatológico (MARCHETTI et al, 2020), foi calculada pela subtração da capacidade máxima respiratória (ETS) pela Rotina.

### **3.9 Quantificação de ATP intracelular**

A determinação de ATP intracelular foi feita usando o kit CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Epimastigotas após 7 dias de cultivo foram colhidos e tratados com a LQB-118 diluída no meio de cultura BHI acrescido de 10 % SFB por 24-48 horas. Parasitos cultivados somente com meio de cultura BHI + 10 % SFB contendo 0,02% DMSO foram utilizados como controle. Após os tempos de tratamento, os parasitos foram ajustados para a concentração de  $1 \times 10^7$  células/ml, centrifugados a 2.500 g por 10 minutos, lavados duas vezes e ressuspensos em 200 µl de PBS a temperatura ambiente. Então, 50 µl da ressuspensão foi transferida para uma placa de 96 poços escura em triplicata e 50 µl do reagente CellTiter-Glo (Promega) foi adicionado diretamente nos poços junto com os parasitos ressuspensos. A placa foi incubada no escuro por 10 minutos à temperatura ambiente e a bioluminescência foi analisada usando o Envision<sup>R</sup> 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer). A concentração de ATP foi calculada através de uma curva padrão de ATP e o resultado foi expresso como % de ATP em relação ao grupo controle.

### **3.10 Análise ultraestrutural de epimastigotas tratados através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)**

Para avaliar se a LQB-118 é capaz de provocar alterações estruturais no parasito, foi feita a análise através de MEV e MET. Epimastigotas colhidos após 7 dias de cultivo foram ajustados para concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/ml, centrifugados a 2.500 g por 10 minutos e ressuspensos com a solução de 2,5 e 25 µM LQB-118 diluída no meio de cultura BHI acrescido de 10 % de soro fetal bovino inativado. O controle foi parasito cultivado somente com meio de cultura BHI + 10 % de soro fetal bovino inativado contendo 0,02% DMSO. A incubação foi feita a 27° C por 48 horas. Após esse tempo, os parasitos foram centrifugados, lavados duas vezes e ressuspensos em PBS à temperatura ambiente. Para o processamento de

MEV, as amostras foram então aderidas em lamínulas redondas impregnadas com poli-L-lisina por 30 minutos e fixadas em solução de Karnovsky (4% paraformaldeído + 2,5% glutaraldeído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio pH 7,2) por 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram lavadas 3 vezes com 0,1 M tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio + 0,8% ferrocianeto de potássio por 40 minutos, lavadas 3 vezes com água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de etanol com 30 minutos em cada concentração, submetidas a secagem em câmara de ponto crítico, as lamínulas foram montadas em *stubs* e metalizadas com camada de ouro por 120 segundos e 25 miliampere. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura SEM-FEG Jeol JSM-7100F a 15 KV no NANOFAB/UERJ.

Para o processamento de MET, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 2.500 g por 10 minutos, lavadas 3 vezes com tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio + 0,8% ferrocianeto de potássio por 40 minutos, lavadas 3 vezes com água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de etanol com 30 minutos em cada concentração, incluídas em resina Epóxi-Epon de forma gradativa nas proporções 2:1, 1:1, 1:2 (acetona:resina) e ao final em resina pura com 12 horas entre cada proporção, a resina com as amostras foi polimerizada a 60°C por 72 horas, e então os blocos com as amostras foram processados através de ultramicrotomia, onde cortes ultrafinos de 60 nm foram obtidos no ultramicrotomo Leica EM UC6, esses cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados com 5 % acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 3 minutos. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão HITACHI HT 7800 a 100 KV no CENABIO/UFRJ.

### 3.11 Análise estatística

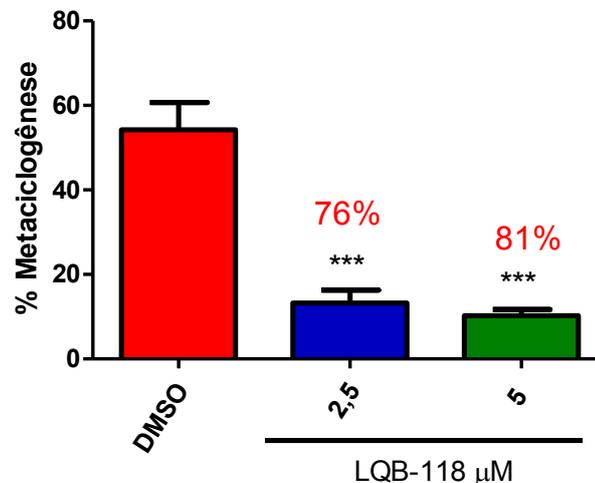
Os dados obtidos foram analisados pelo teste de análise de variância de entrada única (one-way ANOVA) com pós-teste de Tukey utilizando o programa “Graph Pad Prism 6”. Valores de *P* iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade da LQB-118 sobre a metaciclogênese

Para avaliar se a LQB-118 interferiria na diferenciação de tripomastigotas metacíclicos, os parasitos foram tratados com a pterocarpanoquinona durante a indução da metaciclogênese *in vitro*. Ao final do ensaio, alíquotas das culturas foram coradas e analisadas quanto a quantidade de tripomastigotas em microscopia óptica de luz. Os resultados mostraram que a LQB-118 inibiu a metaciclogênese em 76% a 2,5  $\mu\text{M}$  e 81% a 5  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle não tratado, diminuindo a formação de tripomastigotas metacíclicos infectantes (Gráfico 1).

Gráfico 1- Efeito da LQB-118 sobre a metaciclogênese

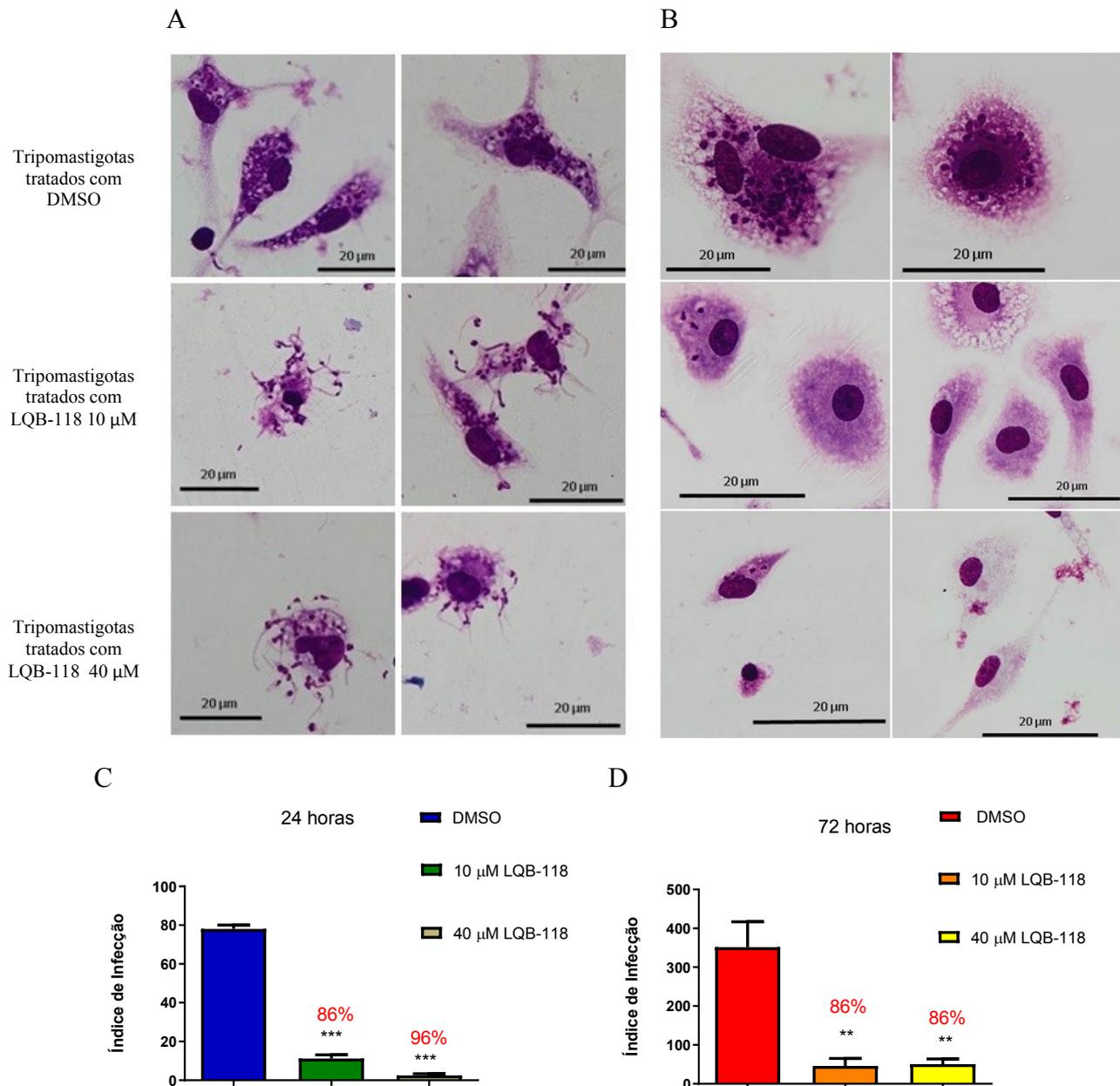


Legenda: Epimastigotas foram submetidos ao processo de metaciclogênese e tratados com a LQB-118 por 96 horas a 27° C. O controle foi parasitos cultivados somente com meio de cultura TAU e TAU3AAG contendo DMSO a 0,02%. Foi feita a contagem em microscopia de luz e o resultado expresso como % de metaciclogênese. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle com DMSO pelo teste one-way ANOVA (pós-teste de Tukey). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. (n=3).

#### 4.2 Influência da LQB-118 sobre a infectividade de tripomastigotas metacíclicos

Com o objetivo de verificar se o tratamento com a LQB-118 seria capaz de alterar a infectividade de tripomastigotas metacíclicos, os parasitos foram incubados com 10 e 40  $\mu\text{M}$  LQB-118 a por 48 horas e usados para infectar monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongo Swiss. Após 24 e 72 horas de interação foi feita a coloração e determinação do Índice de Infecção. As imagens mostram, com 24 horas de interação, que quando os tripomastigotas foram previamente tratados com a LQB-118 havia mais parasitos não internalizados ao redor de macrófagos, quando comparado com o controle (tripomastigotas tratados somente com DMSO) (Figura 15 A). Após 72 horas de incubação, tempo esse suficiente para os tripomastigotas se internalizarem nos macrófagos, se diferenciarem em amastigotas e se multiplicarem, observamos que quando nas culturas em que os tripomastigotas foram previamente tratados com a LQB-118 havia poucas ou nenhuma amastigota no interior dos macrófagos comparado ao controle não tratado (Figura 15 B). A quantificação de parasitos no interior dos macrófagos mostrou que houve a redução no Índice de infecção no tratamento com a LQB-118. Em 24 horas, a redução foi de até 96% com 40  $\mu\text{M}$  LQB-118 e 86% em 72 horas comparado ao controle não tratado (Figura 15 C e D), mostrando que a molécula interfere com a capacidade do parasito de infectar macrófagos peritoneais.

Figura 15 - Efeito da LQB-118 sobre a infectividade de tripomastigotas metacíclicos

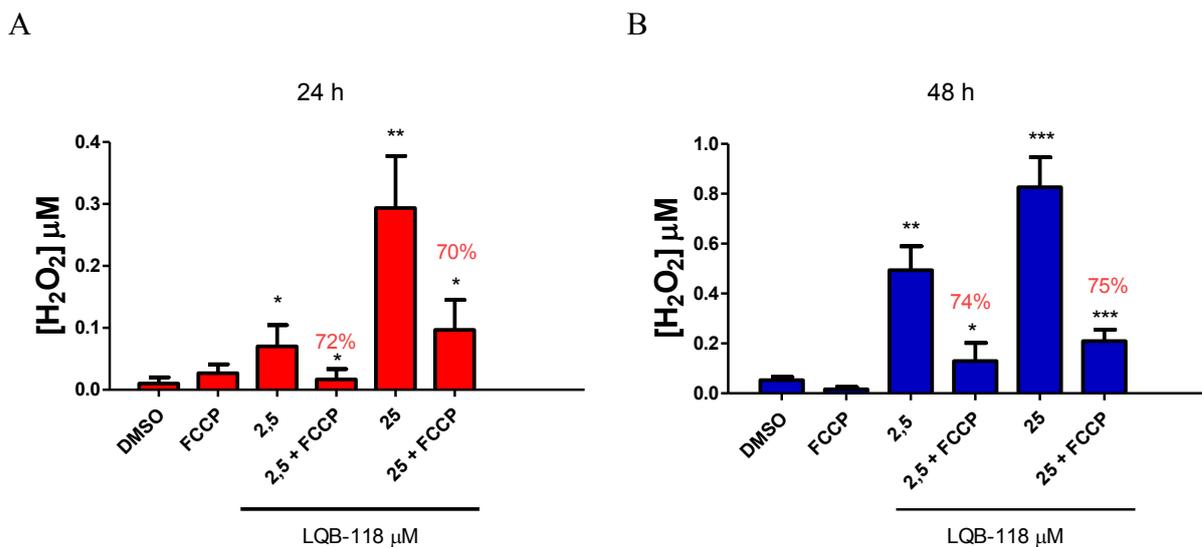


Legenda: Tripomastigotas metacíclicos tratados com a LQB-118 10 e 40  $\mu$ M por 48 horas foram usados para infectar macrófagos peritoneais de camundongos Swiss e após 24 e 72 horas, as amostras foram fotografadas e observadas por microscopia de luz. Parasitos cultivados somente com meio de cultura RPMI + 10 % de soro fetal bovino inativado contendo DMSO a 0,02% foram utilizados como controle. (A) - Imagens da interação entre controle ou parasitos tratados e macrófagos peritoneais com 24 horas. (B) - Imagens da interação entre controle ou parasitos tratados e macrófagos peritoneais com 72 horas. Além das imagens observadas por microscopia de luz, o Índice de Infecção também foi determinado. (C) - Índice de Infecção após 24 horas de interação. (D) Índice de Infecção após 72 horas de interação. \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle pelo teste one-way ANOVA (pós-teste de Tukey). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. (n=3). Barra = 20  $\mu$ m.

### 4.3 Análise na formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de parasitos tratados com a LQB-118

Para verificar se o tratamento com a LQB-118 levaria a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no parasito, epimastigotas foram tratados com a LQB-118 por 24 e 48 horas. Após esses tempos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido em resposta à incubação com a molécula foi mensurado utilizando a sonda fluorescente Amplex red. O gráfico 2 mostra o aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 73% e 97% respectivamente a 2,5 e 25 µM LQB-118 em 24 horas e 90% e 94% em 48 horas comparado ao controle com DMSO (Gráfico 2 A e B). Esse efeito foi dose dependente. Para avaliar se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve origem mitocondrial, foi adicionado o ionóforo de prótons FCCP, que permite a translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna permitindo que o consumo de oxigênio mitocondrial ocorra em sua razão máxima e isso leva a um menor vazamento de elétrons, diminuindo a possibilidade da redução incompleta do oxigênio à superóxido e assim a uma menor geração de ROS (ARONIS et al, 2002; MARCHETTI et al, 2020). O FCCP, então, diminuiu a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida pela LQB-118 em 72% e 70% comparado respectivamente a 2,5 e 25 µM LQB-118 em 24 horas e 74% e 75% em 48 horas, mostrando assim, que uma grande proporção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado foi de origem mitocondrial.

Gráfico 2 - Determinação de ROS em parasitos tratados com a LQB-118

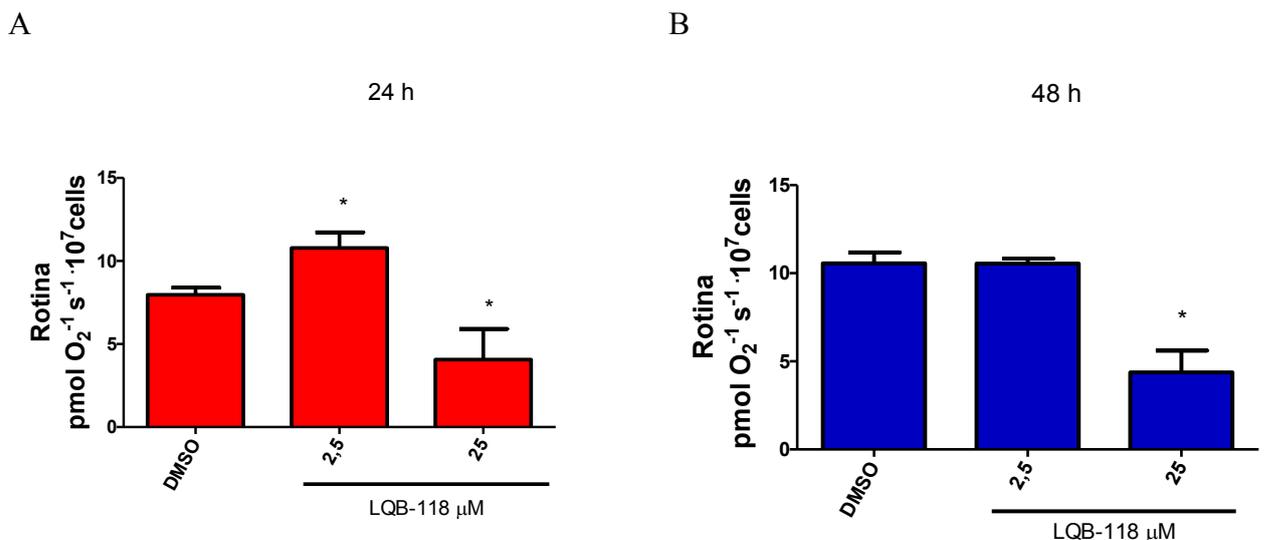


Legenda: Epimastigotas foram tratados com a LQB-118 e após 24 e 48 horas foi feita a dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a sonda Amplex red por fluorimetria. O controle foi parasito cultivado somente com meio de cultura BHI + 10 % de soro fetal bovino inativado contendo DMSO a 0,02%, além do controle com FCCP. O resultado foi expresso como a concentração do peróxido de hidrogênio em µM. (A) - Tratamento com LQB-118 por 24 horas. (B) - Tratamento com LQB-118 por 48 horas. \*\*\* p<0,001. \*\* p<0,05. \* p<0,05 quando comparado ao grupo controle pelo teste one-way ANOVA (pós-teste de Tukey). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. (n=3).

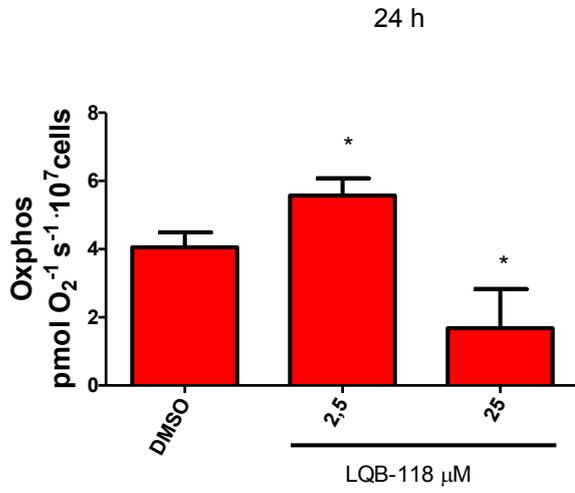
#### 4.4 Análise do consumo de O<sub>2</sub> pós tratamento com a LQB-118

Para avaliar se a LQB-118 levaria a uma alteração no consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial de epimastigotas, os parasitos foram tratados com a molécula por 24 ou 48 horas. Após esses tempos, a análise do consumo de O<sub>2</sub> foi feita utilizando um respirômetro de alta resolução (O2K-OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). De acordo com os resultados, em 24 horas houve aumento no consumo de O<sub>2</sub> com o tratamento de 2,5 µM LQB-118 nos diferentes estados respiratórios (Rotina, Oxphos, Leak, ETS, SCR) comparado ao controle não tratado. Esse aumento não ocorreu em 48 horas com 2,5 µM LQB-118. Já com 25 µM LQB-118 observou-se que houve diminuição no consumo em todos os diferentes estados respiratórios nos dois tempos de tratamento (Gráfico 3 A-L). Houve aumento no consumo de oxigênio não mitocondrial a 25 µM LQB-118 em 24 horas e 2,5 µM LQB-118 em 48 horas (Gráfico 3 I e J). O FCR alterou com 25 µM LQB-118 em ambos os tempos de tratamento, diminuindo o FCR<sub>(Oxphos/ETS)</sub> e aumentando o FCR<sub>(Leak/ETS)</sub> comparado ao controle não tratado (Gráfico 3 M e N). Os resultados mostram, então, que a LQB-118 é capaz de interferir no consumo do oxigênio mitocondrial do parasito, aumentando inicialmente o consumo quando o parasito é tratado com 2,5 µM LQB-118 e diminuindo o consumo no tratamento com 25 µM LQB-118.

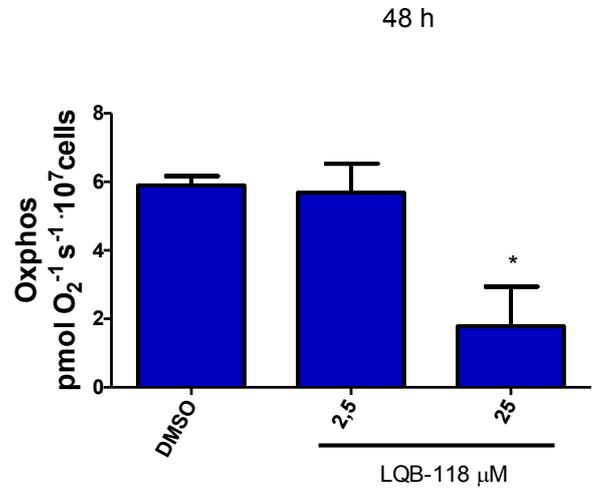
Gráfico 3 - Avaliação do consumo de O<sub>2</sub> em parasitos tratados com a LQB-118



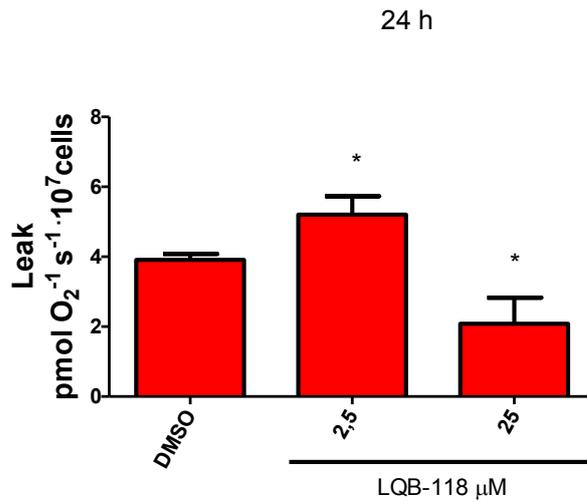
C



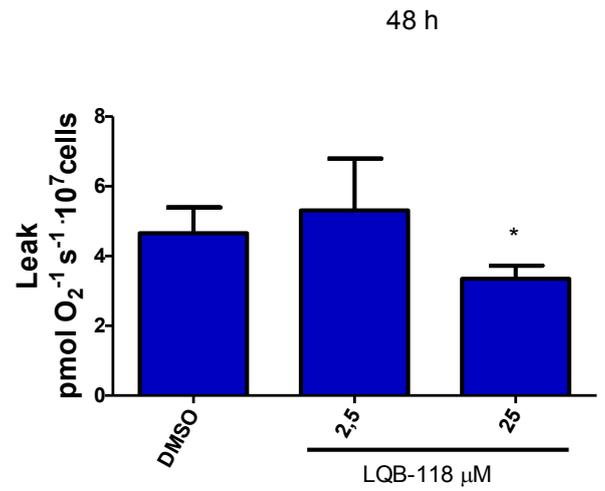
D



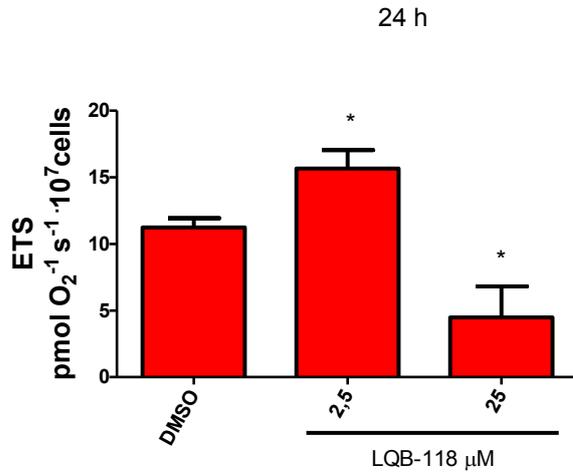
E



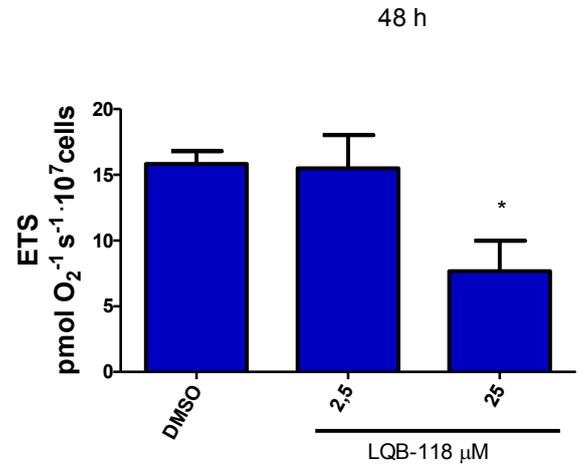
F



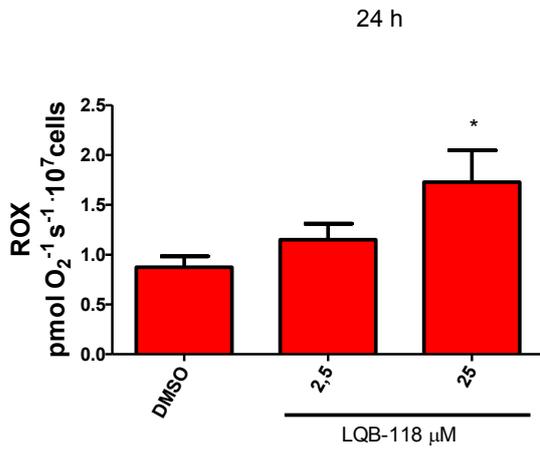
G



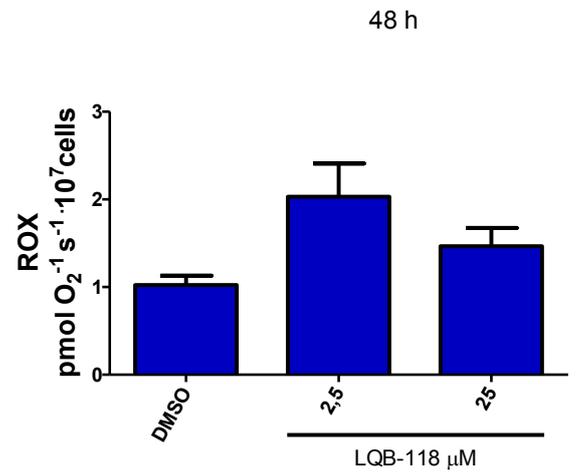
H



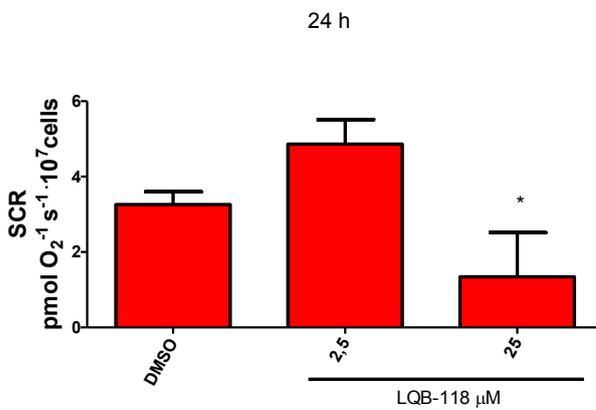
I



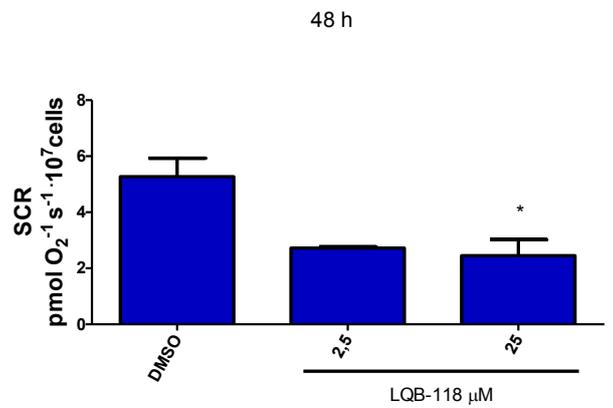
J



K

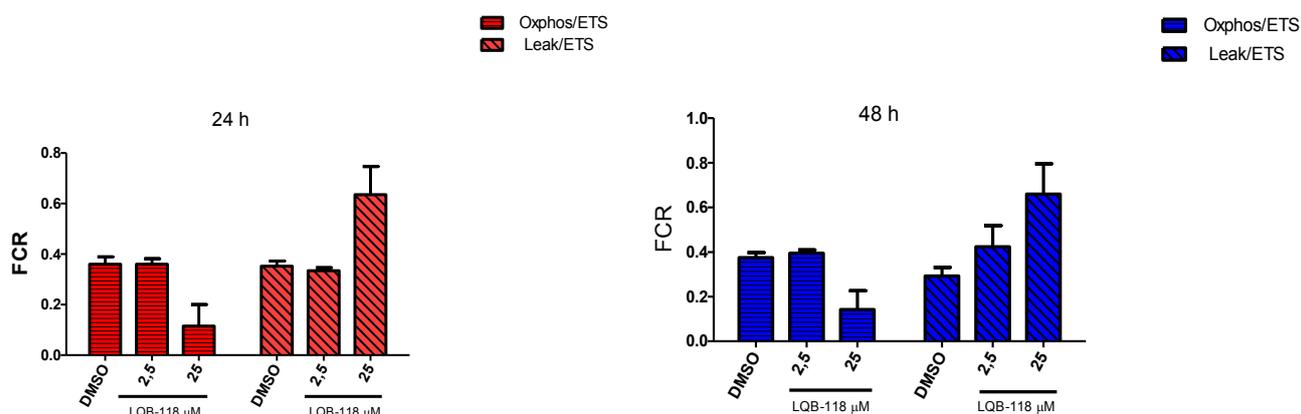


L



M

N

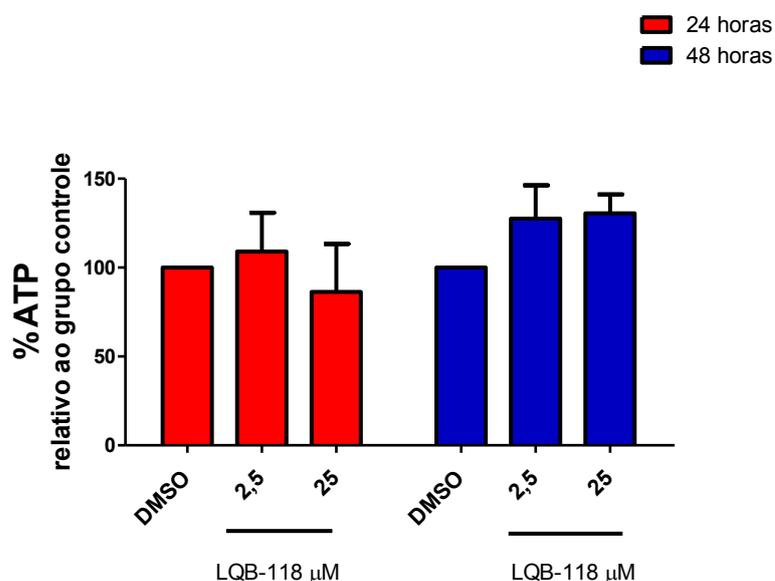


Legenda: Epimastigotas foram tratados com a LQB-118 e após 24 e 48 horas foram submetidos a análise do consumo de O<sub>2</sub> através de respimotria de alta resolução. O controle foi parasito cultivado somente com meio de cultura BHI + 10 % de soro fetal bovino inativado contendo 0,02% DMSO. A concentração e o fluxo de oxigênio foram registrados e analisados utilizando o software DatLab (O2K-OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). (A) Rotina 24 horas. (B) Rotina 48 horas. (C) Oxphos 24 horas. (D) Oxphos 48 horas. (E) Leak 24 horas. (F) Leak 48 horas. (G) ETS 24 horas. (H) ETS 48 horas. (I) ROX 24 horas. (J) ROX 48 horas. (K) SCR 24 horas. (L) SCR 48 horas. (M) FCR 24 horas. (N) FCR 48 horas. \* p<0,05 quando comparado ao grupo controle pelo teste one-way ANOVA (pós-teste de Tukey). Resultado representativo de 4 experimentos independentes. (n=4).

#### 4.5 Quantificação de ATP intracelular

Uma vez que observamos o impacto da incubação da LQB-118 sobre o consumo de O<sub>2</sub> das formas epimastigotas, avaliamos se o tratamento com a LQB-118 interferiria com a concentração de ATP intracelular. Para tal, epimastigotas foram tratados por 24 ou 48 horas e procedeu-se a dosagem de ATP usando o Kit CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi feita por bioluminescência e o resultado foi expresso como % de ATP em relação ao grupo controle. Observou-se que não houve diminuição na concentração de ATP comparado ao controle não tratado em ambas as concentrações de LQB-118 e tempos analisados (Gráfico 4), sugerindo que apesar da LQB-118 modificar a fisiologia mitocondrial do parasito, o conteúdo de ATP intracelular não é afetado pelo tratamento com a molécula.

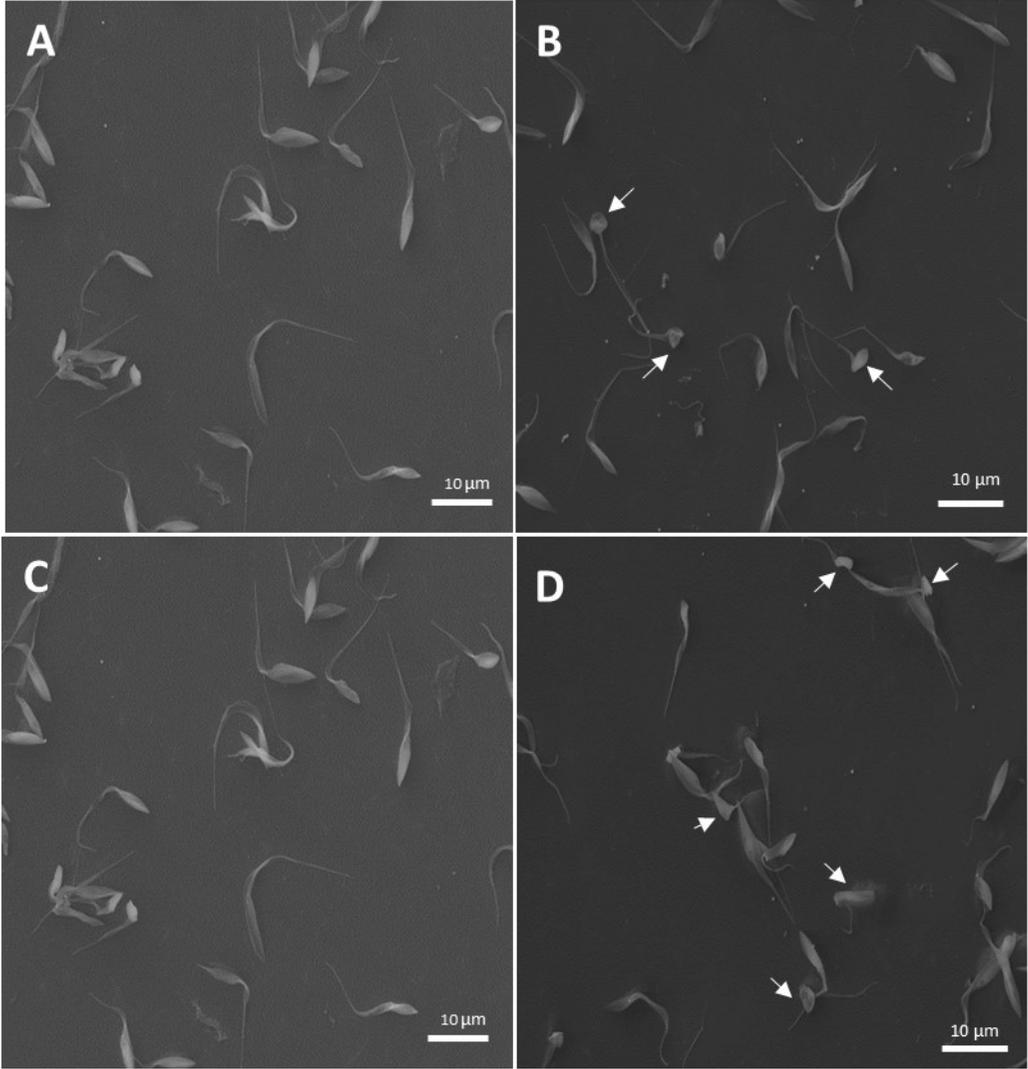
Gráfico 4 - Análise da concentração de ATP pós tratamento com a LQB-118



Legendas: Epimastigotas mantidos em meio BHI + 10% SFB foram tratados com a LQB-118 por 24 e 48 horas e então foi feita a dosagem de ATP usando o kit CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O grupo controle consistiu do parasito cultivado somente em meio BHI + 10 % SBF contendo 0,02% DMSO. O resultado foi expresso como % de ATP em relação ao grupo controle. Resultado representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (n=3).

#### 4.6 Análise da ultraestrutura externa de epimastigotas tratados através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar se o tratamento com a LQB-118 provocaria alterações morfológicas no parasito, foi feita a incubação das formas epimastigotas com a molécula na presença de 2,5 ou 25 µM por 48 horas e foi realizada a microscopia eletrônica de varredura. Em nossas imagens, observamos que parasitos não tratados exibiram corpo celular alongado típico, com flagelo e membrana plasmática sem alterações morfológicas (Figura 16 A, C e E). Ao analisar os parasitos tratados com 2,5 µM LQB-118 observamos um processo de arredondamento e encolhimento das células (Figura 16 B e F). O arredondamento foi observado com maior frequência e mais pronunciado nos parasitos tratados com 25 µM da molécula (Figura 16 D e G). No tratamento com 2,5 µM também observamos alterações no flagelo (Figura 16 H) e com 25 µM pode-se observar a presença de flagelo duplo (Figura 16 I), além da perda da integridade da membrana plasmática. (Figura 16 J). Com base nestes resultados, podemos inferir que a LQB-118 alterou a morfologia geral do corpo celular, do flagelo e da membrana plasmática do parasito.



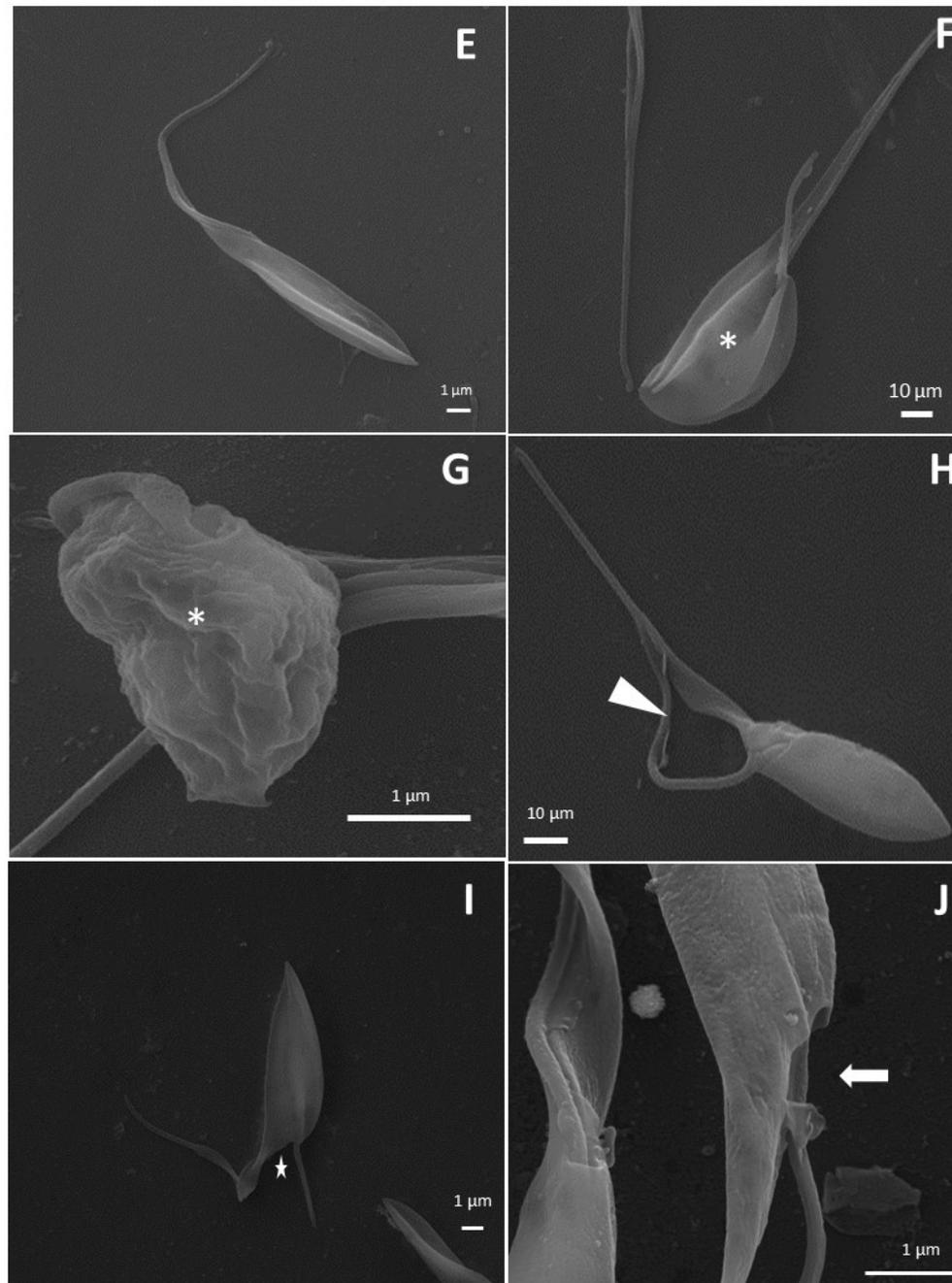
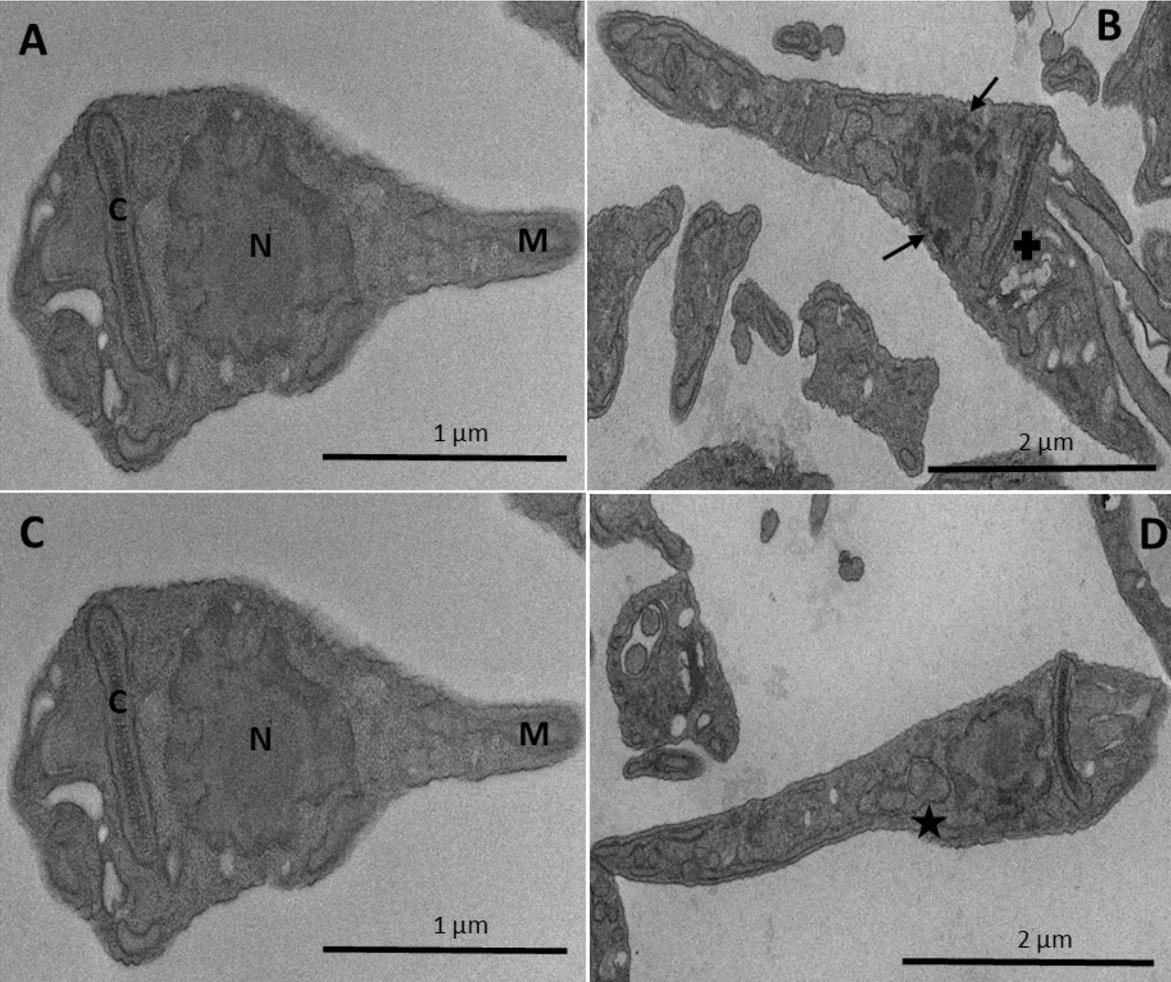


Figura 16: Análise da ultraestrutura externa de epimastigotas tratados com a LQB-118 através de microscopia eletrônica de varredura: O controle foi parasitos cultivados somente com meio BHI + 10 % SBF contendo 0,02% de DMSO (A, C, E). Tratados a 2,5  $\mu\text{M}$  LQB-118 (B, F e H). Tratados a 25  $\mu\text{M}$  LQB-118 (D, G, I e J). Encolhimento celular (seta). arredondamento celular (\*). Destaque do flagelo (triângulo). Parasito com flagelo duplo (estrela). Perda da integridade da membrana (seta grossa). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. (n=2). Barra = 10  $\mu\text{m}$  (A, B, C, D, F e H), 1  $\mu\text{m}$  (E, G, I e J).

#### **4.7 Análise da ultraestrutura de epimastigotas tratados usando a Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para avaliar alterações na ultraestrutura intracelular dos parasitos tratados com a LQB-118, as epimastigotas foram incubadas com 2,5 ou 25  $\mu\text{M}$  LQB-118 por 48 horas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. É possível observar em parasitos não tratados (Figura 17 A, C, E e G) aspecto normal com as estruturas do núcleo, mitocôndria, cinetoplasto e complexo de Golgi preservadas. Parasitos tratados à 2,5  $\mu\text{M}$  promoveram a condensação da cromatina nuclear e desorganização do complexo de Golgi (Figura 17 B), presença de vacúolos autofágicos (Figura 17 D) que também observamos em maior frequência com o tratamento a 25  $\mu\text{M}$  (Figura 17 J), inchaço mitocondrial (Figura 17 F) e a presença de estrutura de membrana concêntrica dentro da organela (Figura 17 H), que também pode ser observada com o tratamento a 25  $\mu\text{M}$  (Figura 17 I). Com base nestes resultados podemos sugerir que a LQB-118 induz alterações ultraestruturais na organização intracelular do parasito.



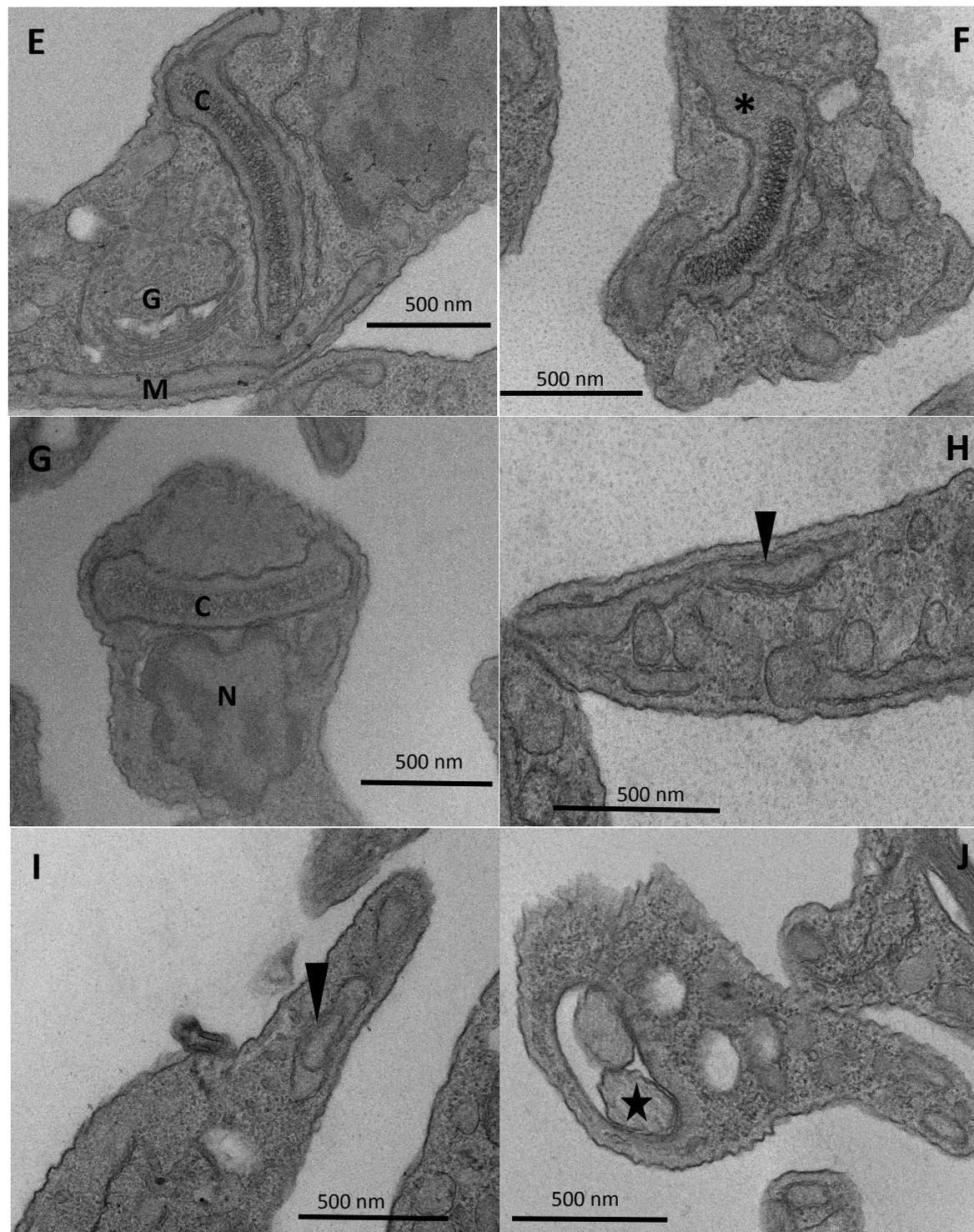


Figura 17: Análise da ultraestrutura de epimastigotas tratados com a LQB-118 usando a microscopia eletrônica de transmissão: O controle foi parasitos cultivados somente com meio BHI + 10 % SBF contendo 0,02% de DMSO (A, C, E e G). Tratados a 2,5  $\mu$ M LQB-118 (B, D, F e H). Tratados a 25  $\mu$ M LQB-118 ( I e J). Condensação da cromatina nuclear (seta). Desorganização do complexo de Golgi (cruz). Formação de vacúolos autofágicos (estrela). Inchaço mitocondrial (\*). Estrutura de membrana concêntrica dentro da mitocôndria (triângulo) N – núcleo, M – mitocôndria, C - cinetoplasto, G – complexo de Golgi. Resultado representativo de 2 experimentos independentes (n=2). Barra = 1  $\mu$ m (A e C), 2  $\mu$ m (B e D), 500 nm (E, F, G, H, I e J).

## 5 DISCUSSÃO

A terapêutica da doença de Chagas ainda é um desafio a ser vencido. A eficácia dos fármacos disponíveis (benznidazol e nifurtimox) é limitada à fase aguda da infecção, são associados a alta toxicidade e a um longo período de tratamento. Portanto, além do problema de adesão ao tratamento em função da sua toxicidade e tempo de tratamento, muitos indivíduos são diagnosticados durante a fase crônica da infecção, quando o tratamento é ineficaz (URBINA, 2014; JESUS et al, 2021). Sendo assim, a pesquisa por novas alternativas terapêuticas torna-se imperativa.

Protozoários da família Trypanosomatidae, como a *Leishmania sp* e o *T. cruzi*, possuem caracteristicamente mitocôndria única com a presença do cinetoplasto que é uma região específica onde está concentrado o DNA mitocondrial (TOMÁS; CASTRO, 2013; BOMBAÇA et al, 2019). Evidentemente, como a sobrevivência do parasito depende da funcionalidade desta organela, isso torna a mitocôndria um alvo importante para o estudo de novos fármacos.

Através de hibridização molecular foi sintetizada a pterocarpanoquinona LQB-118, a qual mostrou atividade sobre várias espécies de *Leishmania*, tendo a mitocôndria como alvo (RIBEIRO et al, 2013; COSTA et al, 2014; CUNHA-JÚNIOR et al, 2016). A LQB-118 também exibiu atividade anti *T. cruzi in vitro* e *in vivo* (AZEVEDO, 2013; BRITO, 2020). Pelo fato da *Leishmania sp* e do *T. cruzi* pertencerem à mesma família, é plausível supor que a LQB-118 também apresente atuação sobre a mitocôndria do *T. cruzi*. Sendo assim, o presente trabalho objetivou ampliar o estudo acerca do efeito inibitório da LQB-118 sobre o *T. cruzi*, explorando a mitocôndria como possível alvo desta molécula no parasito.

No presente estudo verificamos que a LQB-118 reduziu a capacidade infectante das tripomastigotas metacíclicas para macrófagos residentes no peritônio. Em outro estudo com o uso de produtos naturais, como as cumarinas, objetivando também o efeito antiparasitário, foi mostrada a redução da infectividade de tripomastigotas previamente tratadas com essas moléculas e usadas para infectar células Vero *in vitro*. Os autores mostraram que o pré-tratamento do parasito reduziu o número de células Vero infectadas e o número de amastigotas intracelulares por célula associado à redução na expressão de proteínas de superfície do *T. cruzi* responsáveis pela adesão à célula hospedeira como proteínas tipo mucina (TcMUC II), proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs) e pequenos antígenos de superfície de tripomastigotas (TSSA) (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al, 2019). Através da

análise de imagens obtidas por microscopia de luz em nossos resultados, observamos que alguns tripomastigotas pré-tratados com a LQB-118 conseguiram aderir aos macrófagos peritoneais de camundongo mas não foram capazes de invadir as células. Então, novos estudos serão necessários para verificar se a LQB-118 altera moléculas de superfície do parasito responsáveis pela adesão à célula hospedeira.

Neste trabalho mostramos que a metaciclologênese induzida *in vitro* foi significativamente inibida pela LQB-118, demonstrando que a molécula é capaz de interferir na capacidade de diferenciação do parasito, podendo influenciar no curso da infecção. Em outro estudo, foi observado que moléculas com poder oxidante estimulam a proliferação do parasito enquanto que moléculas com poder antioxidante estimulam a metaciclologênese (NOGUEIRA et al, 2015). A LQB-118 mostrou que induz estresse oxidativo sobre células tumorais (DE SÁ BACELAR et al, 2013; MARTINO et al, 2014; MARTINO et al, 2019) e sobre diferentes espécies de *Leishmania* (RIBEIRO et al, 2013; COSTA et al, 2014), corroborando, assim, com o poder pró-oxidante que a molécula apresenta, podendo interferir diretamente na capacidade proliferativa e infectante dos parasitos.

Durante o processo de metaciclologênese, também foi observado que os parasitos tratados com a LQB-118 não aderiram à parede dos frascos de cultura, o que pode ter relação com a interferência da molécula com o processo de diferenciação já que a adesão do parasito é uma etapa importante para iniciar o processo da metaciclologênese (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; CARDOSO; SOARES, 2010). Apesar da LQB-118 ser tóxica para epimastigotas levando-as à morte celular (AZEVEDO, 2013), o efeito sobre a inibição da metaciclologênese pôde ser observado sobre as formas epimastigotas remanescentes já que foi usada a concentração da IC<sub>50</sub> neste trabalho, mostrando que a LQB-118 além de levar à morte celular em uma população de epimastigotas, inibe a diferenciação naquelas formas epimastigotas remanescentes.

MENNA-BARRETO e colaboradores (2009) observaram que a atividade citotóxica de derivados de naftoquinona sobre epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* é precedida da redução ao radical semiquinona preferencialmente pelo complexo I (NADH:ubiquinona oxidoreductase) presente na membrana interna mitocondrial. Entretanto, CARRANZA e colaboradores (2009) mostraram que o complexo I mitocondrial do *T. cruzi*, apesar de presente, não é funcional. É possível que outras redutases estejam envolvidas na redução desses derivados de naftoquinonas, assim como da LQB-118, a qual também é uma derivada da mesma molécula base, a naftoquinona. Estudos foram realizados para avaliar a atuação da enzima TcAKR, uma aldo-ceto redutase de *T. cruzi* com atividade de quinona oxidoreductase,

e foi observado que ela atuou na redução do  $\beta$  lapachol e outras orto naftoquinonas, com geração do radical semiquinona e efeitos citotóxicos para o parasito, como a formação de ROS, perda do potencial de membrana e formação de autofagossomos (GARAVAGLIA et al, 2010; GARAVAGLIA et al, 2018). A LQB-118 também poderia estar atuando como substrato para essa enzima, contudo estudos necessitam ser conduzidos para comprovar essa hipótese.

O radical semiquinona formado dos derivados de naftoquinonas não é oxidado pelo complexo III se acumulando na membrana interna mitocondrial onde reage diretamente com o oxigênio molecular produzindo o ânion superóxido que, assim, pode ser convertido a  $H_2O_2$  por superóxido dismutases. A alta produção de espécies reativas de oxigênio levam ao estresse oxidativo que tem efeitos deletérios para o parasito (MENNA-BARRETO et al, 2009). No presente trabalho, observamos que houve aumento na produção de  $H_2O_2$  em epimastigotas induzido pela LQB-118, corroborando com os dados anteriores sobre o poder oxidante que a molécula possui. Esse efeito foi maior com a concentração de 25  $\mu M$  e com o maior tempo de tratamento, de 48 horas. Por apresentar em sua estrutura química uma naftoquinona, a LQB-118 também pode estar induzindo a formação de  $H_2O_2$  através da reação de seu radical reduzido semiquinona com o oxigênio molecular. Para a detecção de peróxido foi usada a sonda fluorescente Amplex red que na presença de peroxidase gera resorufina. Na mitocôndria, a Amplex red também pode ser convertida a resorufina por carboxilestearases independentemente de  $H_2O_2$  ou peroxidase (MIWA et al, 2016). Então para avaliar se a resorufina liberada foi produto da reação entre o  $H_2O_2$ , a Amplex Red e HRP e também se o  $H_2O_2$  formado é de origem mitocondrial, foi adicionado um controle com FCCP, o qual transloca prótons através da membrana mitocondrial interna permitindo que a respiração mitocondrial atinja sua razão máxima levando a um menor vazamento de elétrons e como consequência ocorre menor formação de ROS. Pelos resultados (Gráfico 2 A e B), quando o FCCP foi adicionado junto com a LQB-118 houve diminuição do sinal fluorescente em ambas as dosagens de 2,5 e 25  $\mu M$  e tempos de tratamento usados, dando indícios de que o produto fluorescente resorufina foi resultado da reação entre o  $H_2O_2$ , o Amplex Red e HRP e que o  $H_2O_2$  formado seria de origem mitocondrial.

Visto que a LQB-118 estimulou a formação de ROS em epimastigotas de *T. cruzi*, partimos para avaliar o efeito dessas espécies reativas na mitocôndria e assim estudamos o consumo de oxigênio de parasitos desafiados com a LQB-118 em diferentes estados respiratórios. O tratamento do *T. cruzi* com 2,5  $\mu M$  LQB-118 por 24 horas aumentou o consumo do  $O_2$  nos diferentes estados respiratórios (Rotina, Oxphos, Leak, ETS e SRC),

mostrando que houve aumento da fosforilação oxidativa, além da elevação no fluxo de elétrons do sistema de transporte de elétrons pelo aumento no metabolismo de substratos. Dessa maneira, a fosforilação oxidativa conseguiu utilizar a mesma capacidade do sistema de transporte de elétrons, que do controle não tratado, para a produção de ATP, evidenciado pela aproximação do  $FCR_{(Oxphos/ETS)}$  e  $FCR_{(Leak/ETS)}$  entre controle e tratado a 2,5  $\mu\text{M}$ , e mostrando, assim, o acoplamento entre eles.

DAWSON e colaboradores (2020) estudaram o efeito do envelhecimento na função mitocondrial em aves da espécie *Taeniopygia guttata* e observaram que senescência causava perda da qualidade mitocondrial associada ao aumento de ROS. Também observaram compensação com aumento no consumo de  $\text{O}_2$  nos estados Rotina, Oxphos e ETS, além do aumento do volume mitocondrial, para prevenir a diminuição na síntese de ATP. Já MARTINS e colaboradores (2020) observaram que epimastigotas de *T. cruzi* quando tratados com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apresentavam lesões no DNA nuclear e mitocondrial. O reparo dessas lesões por enzimas de reparo presentes no parasito foi acompanhado por um aumento no consumo de  $\text{O}_2$ , o qual foi normalizado ao final do processo de restauração do DNA (MARTINS et al, 2020). Então, é possível supor que a formação de ROS estimulada pela LQB-118 possa ter causado lesões ao DNA mitocondrial e nuclear, e que mecanismos compensatórios possam ter ocorrido para manter os níveis de ATP similares ao controle não tratado (Gráfico 4) para o reparo, tais como o aumento da capacidade de trabalho da maquinaria da fosforilação oxidativa e o aumento do metabolismo de substratos, resultando num maior suprimento de elétrons para o sistema de transporte de elétrons. Assim o ATP poderia ser usado no processo de reparo das lesões causadas pelo ROS. É possível que com 48 horas de tratamento com 2,5  $\mu\text{M}$  LQB-118, essas lesões já estivessem reparadas e a função mitocondrial reestabelecida já que não houve diferença no consumo do  $\text{O}_2$  comparado ao controle não tratado. Podemos observar também que houve aumento no volume mitocondrial já que através dos estudos de microscopia eletrônica de transmissão observamos um inchaço mitocondrial de parasitos tratados. Já a 25  $\mu\text{M}$  LQB-118, em ambos os tempos de tratamento, observamos a diminuição do consumo de  $\text{O}_2$  nos diferentes estados, resultado sugestivo de que a maquinaria da fosforilação oxidativa e o sistema de transporte de elétrons mitocondrial possam ter sido afetados.

Quando as espécies reativas de oxigênio excedem a capacidade antioxidante, leva ao estresse oxidativo (PELOSO et al, 2012). Esse fenômeno foi observado após o tratamento com derivados de naftoquinonas, assim como do  $\beta$  lapachol, que aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio em epimastigotas, além de causar inibição dos complexos

mitocondriais III e IV bloqueando o fluxo de elétrons do sistema de transporte de elétrons afetando também o potencial de membrana mitocondrial e diminuindo o consumo de  $O_2$ , mostrando que o estresse oxidativo superou a capacidade antioxidante mitocondrial (MENNA-BARRETO et al, 2009). No presente estudo, o mesmo processo pode ter sido induzido pela LQB-118. É possível que a concentração de 25  $\mu M$ , uma concentração 10 x maior que a  $IC_{50}$ , tenha excedido a capacidade antioxidante mitocondrial do parasito causando as alterações mitocondriais observadas. Além disso, o parasito não obteve uma demanda de energia extra para resistir ao estresse oxidativo, devido à baixa capacidade de reserva (SCR) observada. BOMBAÇA e colaboradores (2019) também observaram que os parasitos tratados com os naftoimidazóis aumentaram ROS, assim como a atividade da tripanotiona redutase e os efeitos deletérios como a diminuição do consumo de  $O_2$  e inibição dos complexos mitocondriais acompanharam os parasitos tratados, mostrando que o estresse oxidativo superou a capacidade antioxidante mitocondrial (BOMBAÇA et al, 2019). Estudos são necessários para avaliar como está a capacidade antioxidante mitocondrial do parasito frente ao tratamento com a LQB-118. Observamos, também, que em ambos os tempos de tratamento com 25  $\mu M$  LQB-118, o  $FCR_{(Oxphos/ETS)}$  esteve baixo e o  $FCR_{(Leak/ETS)}$  alto. Este dado demonstra que o sistema de transporte de elétrons e a respiração estão mais associadas ao Proton Leak, com baixa capacidade da fosforilação oxidativa em utilizar o sistema de transporte de elétrons para a produção de ATP evidenciando, assim, um desacoplamento. O desacoplamento da fosforilação oxidativa do sistema de transporte de elétrons pode ser causado por inibição de complexos mitocondriais com redução na oxidação de substratos (SAPPAL et al, 2015; DE CARVALHO et al, 2017; FÉLIX et al, 2017). Esse processo, então, pode estar ocorrendo nas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com a maior concentração de LQB-118 (25  $\mu M$ ), havendo a necessidade de uma avaliação complementar sobre a atividade dos complexos mitocondriais para comprovação.

O tratamento do parasito com a LQB-118 não alterou a concentração de ATP comparado ao controle não tratado. Os níveis de ATP intracelular em parasitos tratados com a  $IC_{50}$  da LQB-118 acompanharam os resultados da análise do consumo de oxigênio em Oxphos sugerindo que o ATP pode estar sendo produzido na mitocôndria através da fosforilação oxidativa. Quando tratados com 25  $\mu M$  LQB-118, houve diminuição do consumo de oxigênio em Oxphos mas a análise de ATP intracelular não alterou em relação ao controle. Com a produção de ATP mitocondrial diminuída, o ATP pode estar sendo produzido através da via glicolítica. SARAIVA e colaboradores (2022) demonstraram que epimastigotas em hipóxia tiveram a produção de ATP através da fosforilação oxidativa diminuída, mas que o

ATP se mantinha alto quando comparado a parasitos em normóxia em consequência do aumento do metabolismo glicolítico. A produção de ATP através da via glicolítica parece ser, então, um dos mecanismos adaptativos do parasito quando a produção mitocondrial de ATP por meio da fosforilação oxidativa está prejudicada. Esse mecanismo compensatório pode estar acontecendo quando os parasitos são desafiados com a LQB-118. Um outro mecanismo adaptativo que pode explicar como o tratamento com 25  $\mu$ M LQB-118 não afetou a produção intracelular de ATP seria a redução da demanda energética pelo parasito. O *T. cruzi* necessita de energia para seus processos biológicos como proliferação, diferenciação, infectividade, sobrevivência intracelular e resistência a diferentes condições de estresse (SOUZA et al, 2020). A redução da demanda energética é uma estratégia utilizada por muitos organismos eucariotos quando submetidos a um estresse ambiental. Assim, o metabolismo é reduzido e a utilização de ATP é reservada para os processos essenciais de resistência ao estresse e sobrevivência da célula (STOREY; STOREY, 2007). No intuito de sobreviver ao estresse oxidativo provocado por concentrações mais altas da LQB-118, o parasito pode estar reduzindo sua demanda de energia com o objetivo de sobreviver ao estresse. Resultados similares foram obtidos por MARTINS e colaboradores (2020), que estudaram a cinética de reparo de lesões nucleares e mitocondriais no *T. cruzi* causadas pelo carcinogênico metanossulfonato de metila. Os autores observaram que as lesões causadas pelo carcinogênico no núcleo e na mitocôndria foram reparadas em 24 horas e somente a partir desse tempo o parasito começou a proliferar, não havendo alteração nos níveis de ATP entre as células tratadas e não tratadas durante as 24 horas. Inicialmente a célula direciona sua energia para o reparo de lesões com o objetivo de sua sobrevivência e somente depois a proliferação do parasito é iniciada. Portanto, estudos complementares serão necessários para avaliar o padrão de proliferação das formas epimastigotas com a possível redução da sua demanda energética causada pelo tratamento com a LQB-118 em 24 e 48 horas. Interessantemente, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a LQB-118 reduziu significativamente o número de epimastigotas e amastigotas intracelulares, após 96 e 72 horas de tratamento, respectivamente, reduzindo também a motilidade das formas tripomastigotas após 48 horas (AZEVEDO, 2013).

As imagens da ultraestrutura dos parasitos mostraram que a mitocôndria do parasito foi alvo da molécula, onde foi evidenciado inchaço mitocondrial e estruturas de membrana concêntrica na organela dos parasitos tratados. Esses dados corroboram com os estudos realizados em *Leishmania amazonensis*, onde foi mostrado que o tratamento com a LQB-118 induziu inchaço mitocondrial, além de desorganização do complexo de Golgi e condensação

da cromatina nuclear (RIBEIRO *et al*, 2013), alterações estas observadas também com o *T. cruzi* no presente trabalho. Os resultados mostram, então, que assim como em *Leishmania*, a LQB-118 atua de maneira similar no *T. cruzi* tendo como alvo principal a mitocôndria desses parasitos, ambos pertencentes à família Trypanosomatidae. Foram observados também no presente estudo, a presença de estruturas de membrana concêntrica dentro da mitocôndria e vacúolos autofágicos na célula, sugestivos de morte celular por autofagia (PEDRA-REZENDE *et al*, 2021). A autofagia é o processo natural de reciclagem de estruturas celulares durante o crescimento e desenvolvimento celular. Esse processo também auxilia na sobrevivência das células quando há limitação nutricional ou algum dano celular, onde organelas ou o conteúdo celular são entregues aos lisossomos para serem autodigeridos. Quando ocorre uma hiperativação do processo de autofagia e os esforços da célula para sua sobrevivência falham, leva à morte celular (ZANDBERGEN *et al*, 2010; YONEKAWA; THORBURN, 2013; DENTON; KUMAR, 2019). Apesar dos indícios que a LQB-118 causa morte celular por apoptose em células tumorais e em *Leishmania* (DE SÁ BACELAR *et al*, 2013; RIBEIRO *et al*, 2013; COSTA *et al*, 2014; MARTINO *et al*, 2014; MARTINO *et al*, 2019), alguns trabalhos sugeriram que derivados de naftoquinonas levaram à morte celular por autofagia em epimastigotas do *T. cruzi*. Quando o parasito foi tratado com esses derivados, exibiu a formação de autofagossomos (MENNA-BARRETO *et al*, 2009; LARA *et al*, 2018).

Já DOS ANJOS e colaboradores (2016) observaram que o tratamento de epimastigotas com um derivado do  $\beta$  lapachol induziu morte celular com características de apoptose, autofagia e necrose, com fragmentação de DNA nuclear, exposição de fosfatidilserina, formação de autofagossomos e perda de integridade da membrana plasmática. No presente trabalho, além de características sugestivas de morte celular por autofagia observadas por MET, as imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram o arredondamento e encolhimento de parasitos tratados. Essas últimas características, assim como a condensação da cromatina nuclear observada na microscopia eletrônica de transmissão, são sugestivas de morte celular por apoptose (XU; LAI; HUA, 2019). A autofagia e apoptose podem levar à morte celular isoladamente ou em um processo combinado entre elas onde a indução de autofagia pode coincidir com a indução de apoptose com a morte celular ocorrendo por esta última via, a indução da autofagia pode ativar e desencadear a morte celular por apoptose ou pode haver uma ação coordenada entre a apoptose e autofagia e ambas levarem à morte celular (DENTON; KUMAR, 2019). O tratamento com a maior concentração de LQB-118 (25  $\mu$ M), induziu alterações no flagelo e perda da integridade de membrana plasmática no

parasito, sugestivo de morte celular por necrose (D' ARCY; 2019). DE PAULA e colaboradores (2020) observaram efeito similar no flagelo e na membrana plasmática quando epimastigotas foram tratados com 1,5- diarilpentanóide dibenzilidenoacetona e esses efeitos foram tempo e concentração dependentes. O processo de autofagia quando exacerbado pode levar à morte celular por necrose (PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2013; DOS ANJOS et al, 2016), o que nos leva a sugerir que o tratamento com 25  $\mu$ M LQB-118 pode ter induzido um processo de autofagia exacerbado no parasito, levando à perda da integridade de membrana e possivelmente à morte celular por necrose. Como foi observado que existem características presentes dos três processos de morte celular no presente trabalho, outros estudos são necessários para delinear o mecanismo de morte celular envolvido no tratamento do *T. cruzi* com a LQB-118.

Em resumo, os estudos da LQB-118 sobre o *T. cruzi* mostram que a molécula tem como alvo a mitocôndria do parasito, estimulando a formação de ROS dose e tempo dependente levando ao estresse oxidativo que altera o metabolismo mitocondrial de forma concentração-dependente, aumentando o consumo de  $O_2$  como um mecanismo compensatório para manter os níveis de ATP normais e em doses mais altas de LQB-118 o consumo de  $O_2$  é diminuído, possivelmente por danos causados pelo estresse oxidativo ao sistema de transporte de elétrons e à maquinaria da fosforilação oxidativa que pode ter superado a capacidade antioxidante do parasito. Além disso, em doses mais altas de LQB-118, o parasito utiliza outros mecanismos compensatórios para manter os níveis de ATP normais quando a sua produção através da fosforilação oxidativa está diminuída, no intuito de sua sobrevivência. O tratamento também afeta algumas funções no parasito como infectividade e metaciclogênese, além de provocar alterações ultraestruturais.

## CONCLUSÕES

- a) O tratamento com a LQB-118 reduziu a infectividade em células de mamíferos e seu poder de se diferenciar para tripomastigotas metacíclicos;
- b) A LQB-118 induz a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial em epimastigotas;
- c) Ocorre alterações na bioenergética mitocondrial com o tratamento do parasito com a molécula, afetando o consumo de O<sub>2</sub> nos diferentes estados respiratórios;
- d) O tratamento com a LQB-118 não alterou a concentração intracelular de ATP, possivelmente sustentado por acionamento de mecanismos compensatórios como produção de ATP através da via glicolítica ou redução da demanda energética;
- e) A LQB-118 provoca alterações ultraestruturais na mitocôndria do parasito e sinais de morte celular por apoptose, necrose e autofagia.

## REFERÊNCIAS

- Alencar MB, Girard RBMM, Silber AM. Measurement of Energy States of the Trypanosomatid Mitochondrion. *Methods in Molecular Biology*. 2020; 2116: 655-671.
- Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, Nunes JPS. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (21): 1-29.
- Aronis A, Komarnitsky R, Shilo S, Tirosh O. Membrane Depolarization of Isolated Rat Liver Mitochondria Attenuates Permeability Transition Pore Opening and Oxidant Production. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2002; 4 (4): 647-654.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101 (7): 2034-2039.
- Azevedo, BFD. Atividade *in vitro* da Pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas; 2013.
- Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Advances in Parasitology*. 2017; 97: 1-45.
- Barbosa JMC, Nicoletti CD, Da Silva PB, Melo TG, Futuro DO, Ferreira VF, Salomão K. Characterization and trypanocidal activity of a  $\beta$ -lapachone-containing drug carrier. *Plos One*. 2021; 16(3): 1-13.
- Bera T, Nandi N, Sudhakar D, Akbar MA, Sen A, Das P. Preliminary evidence on existence of transplasma membrane electron transport in *Entamoeba histolytica* trophozoites: a key mechanism for maintaining optimal redox balance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2006; 38 (5-6): 299-308.
- Berg JM, Tymoczko JL, Strayer L. *Bioquímica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Bernardo PS, Guimarães GHC, De Faria FCC, Longo GMDC, Lopes GPDF, Netto CD, Costa PRR, Maia RC. LQB-118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells. *Oncology Reports*. 2020; 43 (1): 346-357.
- Bliek AMVD, Sedensky MM, Morgan PG. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics*. 2017; 207 (3): 843-871.
- Boiani M, Piacenza L, Hernández P, Boiani L, Cerecetto H, González M, Denicola A. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*. 2010; 79: 1736-1745.

Bombaça ACS, Silva LA, Chaves AO, Da Silva LS, Barbosa JMC, Da Silva AM, Ferreira ABB, Menna-Barreto RFS. Novel N,N-di-alkylnaphthoimidazolium derivative of  $\beta$ -lapachone impaired *Trypanosoma cruzi* mitochondrial electron transport system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 135: 111186.

Bombaça ACS, Viana PG, Santos ACC, Silva TL, Rodrigues ABM, Guimarães ACR, Goulart MOF, Júnior ENDS, Menna-Barreto RFS. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazoles. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019; 130: 408-418.

Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2018; 14: 421-447.

Boveris A, Chance B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical Journal*. 1973; 134 (3): 707-716.

Bowman NM, Kawai V, Levy MZ, Carpio JGCD, Cabrera L, Delgado F, Malaga F, Benzaquen EC, Pinedo VV, Steurer F, Seitz AE, Gilman RH, Bern C. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46 (12): 1822-1828.

Brito ACDS. Potencial terapêutico da Pterocarpanoquinona LQB-118 na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas; 2020.

Cano-Domínguez N, Bowman B, Peraza-Reyes L, Aguirre J. *Neurospora crassa* NADPH oxidase NOX-1 is localized in the vacuolar system and the plasma membrane. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 1825.

Cardoso J, Soares MJ. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010; 105 (8): 1026-1032.

Carranza JC, Kowaltowski AJ, Mendonça MAG, De Oliveira TC, Gadelha FR, Zingales B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2009; 41 (3): 299-308.

Carranza JC, Valadares HMS, D'Ávila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LMC, Chiari E, Sturm NR, Gontijo ED, Macedo AM, Zingales B. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas Disease patients from Brazil. *International Journal for Parasitology*. 2009; 39: 963-973.

Castro JA, Mecca MMD, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25: 471-479.

Chao C, Leone JL, Vigliano CA. Chagas Disease: Historic perspective. *BBA – Molecular Basis of Disease*. 2020; 1866 (5): 165689.

- Chagas C. Nova Tripanozomíaze Humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1909; 1: 159-218.
- Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MDNSL, Goldenberg S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988; 83 (1): 123-133.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 1985; 16: 315-327.
- Correa ITS, Costa-Silva TAD, Tempone AG. Bioenergetics impairment of *Trypanosoma cruzi* by the antihypertensive manidipine: A drug repurposing strategy. Acta Tropica. 2021; 214: 105768.
- Costa L, Pinheiro RO, Dutra PML, Santos RF, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, Da Silva AJM, Costa PRR, Da-Silva SAG. Pterocarpanquinone LQB-118 Induces apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters. Plos One. 2014; 9 (10): e109672.
- Cunha-Júnior EFD, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, Canto-Cavalheiro MMD, Silva AJMD, Costa PRR, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1555-1559.
- Cunha-Júnior EFD, Martins TM, Canto-Cavalheiro MM, Marques PR, Portari EA, Coelho MGP, Netto CD, Costa PRR, Sabino KCDC, Torres-Santos EC. Preclinical studies of LQB-118: Subacute toxicity and therapeutic evaluation in experimental visceral leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016; 60 (6): 3794-3801.
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, Kjos S, Gurgel-Gonçalves R, Blanchet D, De Pablos LM, Tomasini N, Da Silva A, Russomando G, Cuba CAC, Aznar C, Abate T, Levin MJ, Osuna A, Gürtler RE, Diosque P, Solari A, Triana-Chávez O, Schijman AG. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. International Journal for Parasitology. 2010; 40 (14): 1599-1607.
- Damasceno FS, Barisón MJ, Pral EMF, Paes LS, Silber AM. Memantine, an Antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, Affects Cell Proliferation, Differentiation and the Intracellular Cycle and Induces Apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. Plos Neglected tropical Diseases. 2014; 8 (2): e2717.
- Dawson NJ, Salmón P. Age-related increase in mitochondrial quantity may mitigate a decline in mitochondrial quality in red blood cells from zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Experimental Gerontology. 2020; 133: 110883.
- De Góes Cavalcanti LP, Rolim DB, Da Justa R, Neto P, Vilar DCLF, Nogueira JOL, Pompeu MMDL, Teixeira MJ, De Sousa AQ. Microepidemics of acute Chagas' Disease by oral transmission in Ceará. Cad. Saude Colet. 2009: 17911-17921.

- Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2019; 26 (4): 605-616.
- De Carvalho NR, Rodrigues NR, Macedo GE, Bristot IJ, Boligon AA, De Campos MM, Cunha FAB, Coutinho HD, Klamt F, Merritt TJS, Posser T, Franco JL. *Eugenia uniflora* leaf essential oil promotes mitochondrial dysfunction in *Drosophila melanogaster* through the inhibition of oxidative phosphorylation. *Toxicology Research*. 2017; 6 (4): 526-534.
- De Paula JC, Bakoshi ABK, Lazarin-Bidóia D, Din ZU, Rodrigues-Filho E, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivate (E)-3-ethyl-4-(4-nitrophenyl) but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2020; 211: 105653.
- De Sá Bacelar T, Silva AJD, Costa PRR, Rumjanek VM. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. *Anticancerdrugs*. 2013; 24 (1): 73-83.
- De Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 2002; 8 (4): 269-285.
- De Souza W, Attias M, Rodrigues JCF. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009; 41 (10): 2069-2080.
- Díaz JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Netto EM, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R. Acute Chagas Disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41 (3): 296-300.
- Díaz ML, González CI. Enfermedad de Chagas agudo: Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud*. 2014; 46: 177-188.
- Docampo R, Moreno SNJ. Free Radical Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi*. *Reviews of Infectious Diseases*. 1984; 6 (2): 223-238.
- Dos Anjos DO, Alves ESS, Gonçalves VT, Fontes SS, Nogueira ML, Suarez-Fontes AM, Da Costa JBN, Rios-Santos F, Vannier-Santos MA. Effects of a novel  $\beta$ -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. *International Journal for Parasitology: Drugs and drug Resistance*. 2016; 6: 207-219.
- Drugs For Neglected Diseases Initiative. Chagas Disease. Searching for shorter, safer, more effective treatments for a silent killer. Disponível em: <<https://dndi.org/wp-content/uploads/2022/11/DNDi-Factsheet-Chagas-2021.pdf>> Acesso em: 26 dez. 2022.
- Dutra PML, Souza JEDO, Ferreira MA, Sodr e CL. Tripanossom ase Americana. "In" : Alves PCDC, Poian ATD, Abrah o A. Bases moleculares em clínica médica. São Paulo: Atheneu; 2010. p. 203-223.

- Enriquez GF, Cardinal MV, Orozco MM, Lanati L, Schijman AG, Gürtler RE. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*. 2013; 140 (3): 303-308.
- El-Bahnasawy MMM, Khater MKA, Morsy TA. African Trypanosomiasis with special reference to Egyptian *Trypanosoma evansi*: Is it a neglected zoonosis? *J. Egypt Soc. Parasitol.* 2014; 44(3) : 741-748.
- Félix LM, Correia F, Pinto PA, Campos SP, Fernandes T, Videira R, Oliveira MM, Peixoto FP, Antunes LM. Propofol affinity to mitochondrial membranes does not alter mitochondrial function. *European Journal of Pharmacology*. 2017; 803: 48-56.
- Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Letters*. 2021; 595 (8): 1062-1106.
- Ferreira DD, Mesquita JT, Silva TADC, Romanelli MM, Batista DDGJ, Da Silva CF, Da Gama ANS, Neves BJ, Melo-Filho CC, Soeiro MDNC, Andrade CH, Tempone AG. Efficacy of sertraline against *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* na *in silico* study. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2018; 24:30.
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharm Res*. 2011; 28 (11): 2758-2770.
- Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *The Journal of Parasitology*. 2000; 86 (6): 1213-1218.
- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clinica*. 2016; 148(3) : 125-131.
- Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death. *Circulation Research*. 2012; 111 (9): 1198-1207.
- Garavaglia PA, Cannata JJB, Ruiz AM, Maugeri D, Duran R, Galleano M, García GA. Identification, cloning and characterization of an aldo-keto reductase from *Trypanosoma cruzi* with quinone oxido-reductase activity. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2010; 173: 132-141.
- Garavaglia PA, Rubio MF, Laverrière M, Tasso LM, Fichera LE, Cannata JJB, García GA. *Trypanosoma cruzi*: Death phenotypes induced by ortho-naphthoquinone substrates of the aldo-keto reductase (TcAKR). Role of this enzyme in the mechanism of action of  $\beta$ -lapachone. *Parasitology*. 2018; 145 (9): 1251-1259.
- García-Huertas P, Cardona-Castro N. Advances in the treatment of Chagas Disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 142: 1-10.
- Goel A, Kumar A, Raghuvanshi A. Synthesis, stereochemistry, structural classification, and chemical reactivity of natural pterocarpanes. *Chemical Reviews*. 2012; 113 (3): 1614-1640.
- Gnaiger E (2020). Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. 5<sup>a</sup> ed. *Bioenerg Commun* 2020.2: 112 pp.

- Góes C. Chega a 40 número de pessoas em tratamento por causa de surto de Doença de Chagas. 2019. Disponível em < [Chega a 40 número de pessoas em tratamento por causa de surto de doença de Chagas | Pernambuco | G1 \(globo.com\)](#)> Acesso em 14 Fev. 2023.
- Goldenberg S, Contreras VT, Bonaldo MC, Salles JM, Franco MPAL, Lafaille J, et al. *In vitro* differentiating systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: Agabian N, Goodman HM, Nogueira N. Molecular strategies of parasitic invasion. New York: Alan R. Liss Inc; 1987. p. 203-212.
- Goldenberg S, Contreras VT, Salles JM, Bonaldo MC, Franco MPAL, Linss J, et al. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79: 39-44.
- Goldenberg S, Contreras VT, Salles JM, Franco MPAL, Bonaldo MC, Valle D, et al. Perspectives for vaccination against Chaga's disease through biotechnology. Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. In: Torrigiani O. New approaches to vaccine development. Basel: Schwabe & Co; 1984. p. 442-459.
- Gonçalves RLS, Menna Barreto RFS, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2011; 43 (6): 651-661.
- Grosso NL, Alarcon ML, Bua J, Laucella SA, Riarte A, Fichera LE. Combined treatment with Benznidazole and Allopurinol in mice infected with a virulent *Trypanosoma cruzi* isolate from Nicaragua. Parasitology. 2013; 140 (10): 1225-1233.
- Guan S, Zhao L, Peng R. Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23 (22): 13880.
- Guarner J. Chagas Disease as example of a reemerging parasite. Seminars in Diagnostic Pathology. 2019; 36 (3): 164-169.
- Gulin JEN, Eagleson MA, López-Muñoz RA, Solana ME, Altcheh J, García-Bournissen F. Voriconazole-Benznidazole Combination Treatment for Chagas Disease. Acta Tropica. 2020; 211 (6): 105606.
- Herst PM, Perrone GG, Dawes IW, Bircham PW, Berridge MV. Plasma membrane electron transport in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the presence of mitochondrial respiratory subunits. FEMS Yeast Research. 2008; 8 (6): 897-905.
- Hill BG, Benavides GA, Lancaster Jr. JR, Ballinger S, Dell'Italia L, Zhang J, Darley-Usmar VM. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. Biological Chemistry. 2012; 393 (12): 1485-1512.
- Jesus SMD, Pinto L, Moreira FDL, Nardotto GHB, Cristofolletti R, Perin L, Fonseca KDS, Barbêdo P, Bandeira LC, Vieira PMDA, Carneiro CM. Pharmacokinetics of Benznidazole in Experimental Chronic Chagas Disease using the Swiss Mouse-Berenice-78 *Trypanosoma cruzi* Strain Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2021; 65 (2):e01383-20.

Kinoshita-Yanaga AT, Toledo MJDO, Araújo SMD, Vier BP, Gomes ML. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Rev Inst Med Trop S Paulo*; 2009; 51 (5): 295-298.

Kratz JM, Bournissen FG, Forsyth CJ, Sosa-Estani S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2018; 11 (10): 943-957.

Kratz JM. Drug discovery for Chagas disease: A viewpoint. *Acta Tropica*. 2019; 198: 105107.

Lara LS, Moreira CS, Calvet CM, Lechuga G, Souza RS, Bourguignon SC, Ferreira VF, Rocha D, Pereira MCS. Efficacy of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: Identification of a promising hit compound. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018; 144: 572-581.

Lerchner J, Sartori MR, Volpe POL, Lander N, Mertens F, Vercesi AE. Direct determination of anaerobe contributions to the energy metabolism of *Trypanosoma cruzi* by chip calorimetry. *Analytical and Bioanalytical chemistry*. 2019; 411 (17): 3763-3768.

López-Vélez R, Norman FF, Bern C. American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infections Disease*. 2020; 98: 762-775.

Maia RC, Vasconcelos FC, Bacelar TDS, Salustiano EJ, Silva LFRD, Pereira DL, 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. *Invest New Drugs*. 2011; 29: 1143-1155.

Mandavilli BS, Santos JH, Houten BV. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*. 2002; 509: 127-151.

Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *Faseb Journal*. 2020; 34 (10): 13106-13124.

Martinez A, Peluffo G, Petruk AA, Hugo M, Piñeyro D, Demicheli V, Moreno DM, Lima A, Batthyány C, Durán R, Robello C, Martí MA, Larrieux N, Buschiazzi A, Trujillo M, Radi R, Piacenza L. Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-mediated Nitration and Inactivation of *Trypanosoma cruzi* Iron-Superoxide Dismutases (Fe-SODs) A and B: Disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289 (18): 12760-12778.

Martino T, Magalhães FCJ, Justo GA, Coelho MGP, Netto CD, Costa PRR, Sabino KCC. 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*. 2014; 22: 3115-3122.

Martino T, Kudrolli TA, Kumar B, Salviano I, Mencalha AL, Coelho MGP, Justo G, Costa PRR, Sabino KCC, Lupold SE. The orally active pterocarpanquinone LQB-118 exhibits

cytotoxicity in prostate cancer cell and tumor models through cellular redox stress. *Prostate*. 2019; 78 (2): 140-151.

Martins TMAS, Peloso EDF, Costa-Silva HM, Rajão MA, Houten BV, Machado CR, Gadelha FR. Mitochondrial behavior during nuclear and mitochondrial DNA repair in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Experimental Parasitology*. 2020; 219:108016.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2007; 146 (4): 601-620.

Mazzeti AL, Capelari-Oliveira P, Bahia MT, Mosqueira VCF. Review on Experimental Treatment Strategies against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2021; 13: 409-432

Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: Identification of target organelles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56: 1034-1041.

Menna-Barreto RFS, Gonçalves RLS, Costa EM, Silva RSF, Pinto AV, Oliveira MF, De Castro SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 47: 644-653.

Menna-Barreto RFS, De Castro SL. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 614014.

Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, De Castro SL. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron*. 2009; 40 (2): 157-168.

Messenger LA, Ramirez JD, Llewellyn MS, Guhl F, Miles MA, Importation of hybrid human-associated *Trypanosoma cruzi* strains of Southern South American origin, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. 2016; 22 (8): 1452-1455.

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Chagas. 2018; <[Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Chagas: relatório de Recomendação — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](#)> Acesso em: 06 de Junho de 2023.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 4ª edição; 2019. <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_4ed.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_4ed.pdf)> Acesso em: 19 de Outubro de 2023.

Ministério da Saúde. Um amanhã sem Chagas. 1ª edição; 2023. <[Um amanhã sem Chagas — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](#)> Acesso em: 19 de Outubro de 2023.

Miwa S, Treumann A, Bell A, Vistoli G, Nelson G, Hay S, Zglinicki TV. Carboxylesterase converts Amplex red to resorufin: Implications for mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release assays. *Free Radical Biology & Medicine*. 2016; 90: 173-183.

- Molina I, Prat JG, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized Trial of Posaconazole and benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2014; 370 (20): 1899-1908.
- Monsalve-Lara J, Liliuso M, Valença-Barbosa C, Thyssen PJ, Miguel DC, Limeira C, Gadelha FR, Fontes FVHM, Pires-Silva D, Dornak LL, Lima MM, Dornalisio MR, Almeida CE. The risk of oral transmission in an área of a Chagas Disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. *Acta Tropica*. 2021; 215: 105803.
- Monteiro WM, Magalhães LK, Filho FSS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MDGV. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas Disease in the Brazilian Western Amazonia. *Tropical Medicine and International Health*. 2010; 15 (9): 1049-1051.
- Monzote L, Gille L. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. *Current Clinical Pharmacology*. 2010; 5 (1): 55-66.
- Morais LS, Dusi RG, Demarque DP, Silva RL, Albernaz LC, Bão SN, Merten C, Antinarelli LMR, Coimbra ES, Espindola LS. Antileishmanial compounds from *Connarus suberosus*: Metabolomics, isolation and mechanism of action. *Plos One*. 2020; 15 (11): 1-22.
- Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2019.
- Morré DJ, Brightman AO. NADH Oxidase of Plasma Membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1991; 23 (3): 469-489.
- Morré DJ, Morré DM. Aging-Related Cell Surface ECTO-NOX Protein, arNOX, a preventive target to Reduce Atherogenic Risk in the Elderly. *Rejuvenation Research*. 2006; 9 (2): 231-236.
- Netto CD, Da Silva AJM, Salustiano EJS, Bacelar TS, Riça IG, Cavalcante MCM, Rumjanek VM, Costa PRR. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- $\alpha$  modulation in human PBMC cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010; 18: 1610-1616.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*. 3ª ed. London: Academic Press; 2002.
- Nogueira NP, Saraiva FMS, Sultano PE, Cunha PRBB, Laranja GAT, Justo GA, Sabino KCC, Coelho MGP, Rossini A, Atella GC, Paes MC. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: Redox status. *Plos One*. 2015; 10 (2): e0116712.
- Nogueira NP, Saraiva FMS, Oliveira MP, Mendonça APM, Inacio JDF, Almeida-Amaral EE, Menna-Barreto RF, Laranja GAT, Torres E JL, Oliveira MF, Paes MC. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. *Free Radical Biology & Medicine*. 2017; 108: 183-191.

Oliveira MDF, Nagao-Dias AT, Pontes VMOD, Júnior ASDS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 2008; 37 (3): 209-228.

Organização Pan Americana de Saúde & Organização Mundial de Saúde. Chagas Disease. 2022; <<https://www.paho.org/en/documents/factsheet-chagas-disease-americas-public-health-workers>> Acesso em : 11 de Dezembro de 2022.

Otero L, Maya JD, Morello A, Rigol C, Barriga G, Rodríguez J, Folch C, Norambuena E, González M, Azar CO, Cerecetto H, Gambino D. Insight into the Bioreductive Mode of Action of Antitrypanosomal 5-Nitrofuryl Containing Thiosemicarbazones. *Medicinal Chemistry*. 2008; 4 (1): 11-17.

Padilla AM, Wang W, Akama T, Carter DS, Easom E, Freund Y, Halladay JS, Liu Y, Hamer SA, Hodo CL, Wilkerson GK, Orr D, White B, George A, Shen H, Jin Y, Wang MZ, Tse S, Jacobs RT, Tarleton RL. Discovery of an orally active benzoxaborole prodrug effective in the treatment of Chagas disease in non-human primates. *Nature Microbiology*. 2022; 7 (10): 1536-1546.

Paes LS, Mantilla BS, Barisón MJ, Wrenger C, Silber AM. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas' Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2011; 17 (20): 2017-2099.

Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, Petruzzella V. The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012; 942: 3-37.

Pedra-Rezende Y, Fernandes MC, Mesquita-Rodrigues C, Stiebler R, Bombaça ACS, Pinho N, Cuervo P, De Castro SL, Menna-Barreto RFS. Starvation and pH stress conditions induced mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagy in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochimica et Biophysica acta Molecular Basis of Disease*. 2021; 1867 (2): 166028.

Peloso EDF, Vitor SC, Ribeiro LHG, Piñeyro MD, Robello C, Gadelha FR. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2011; 43 (4): 419-424.

Peloso EF, Gonçalves CC, Silva TM, Ribeiro LHG, Piñeyro MD, Robello C, Gadelha FR. Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012; 520 (2): 117-122.

Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas Disease. *Lancet*. 2018; 391: 82-94

Portes JDA, Netto CD, Silva AJMD, Costa PRR, DaMatta RA, Santos TATD, De Souza W, Seabra SH. A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Veterinary Parasitology*. 2012; 186 (3-4): 261-269.

Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nature Reviews Microbiology*. 2013; 11 (1): 58-66.

- Quintero-Pertuz H, Veas-Albornoz R, Carrillo I, González-Herrera F, Lapier M, Carbonó-Delahoiz E, Del Olmo E, Feliciano AS, Kemmerling U, Olea-Azar C, Delporte C, Maya JD. Trypanocidal effect of alcoholic extract of *Castanedia santamartensis* (Asteraceae) leaves is based on altered mitochondrial function. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 148: 112761. SN
- Rassi Jr A, Rassi A, Rezende JMD. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin N Am*. 2012; 26 (2): 275-291
- Reigada C, Sayé M, Valera-Vera E, Miranda MR, Pereira CA. Repurposing of terconazole as an anti *Trypanosoma cruzi* agent. *Heliyon*. 2019; 5 (6): e01947.
- Rey L. Bases da parasitologia médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
- Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, Da-Silva SAG, Canto-Cavalheiro MM, Da Silva AJM, Costa PRR, Netto CD, Melo RCN, Almeida-Amaral EE, Torres-Santos EC. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68 (4): 789- 799.
- Rodríguez-Hernández KD, Martínez I, Agredano-Moreno LT, Jiménez-García LF, Reyes-Chilpa R, Espinoza B. Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect *in vitro* infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*. 2019; 61: 152827.
- Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, et al. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16: 668-674.
- Salem MM, Werbovetz KA. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr Med Chem*. 2006; 13 (21): 2571-2598.
- Salustiano EJS, Netto CD, Fernandes RF, Silva AJMD, Bacelar TS, Castro CP, et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol,  $\alpha$ -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Invest New Drugs*. 2009; 28 (2): 139-144.
- Salustiano EJ, Dumas ML, Silva-Santos GG, Netto CD, Costa PRR, Rumjanek VM. *In vitro* and *in vivo* antineoplastic and immunological effects of pterocarpanquinone LQB-118. *Invest New drugs*. 2016; 34 (5): 541-551.
- Sappal R, MacDougald M, Fast M, Stevens D, Kibenge F, Siah A, Kamunde C. Alterations in mitochondrial electron transport system activity in response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 2015; 165: 51-63.
- Saraiva FMS, Cosentino-Gomes D, Inacio JDF, Almeida-Amaral EE, Louzada-Neto O, Rossini A, Nogueira NP, Meyer-Fernandes JR, Paes MC. Hypoxia effects on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes proliferation, differentiation, and energy metabolism. *Pathogens*. 2022; 11(8): 897.

Schlemper Jr BR, Ishida MMI, Steindel M, Gargioni R. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1986; 81 (2): 191-198.

Schmatz DM, Boltz RC, Murray PK. *Trypanosoma cruzi*. Separation of broad and slender trypomastigotes using a continuous hypaque gradient. Parasitology. 1983; 87 (2): 219-227.

Selvam C, Jordan BC, Prakash S, Mutisya D, Thilagavathi R. Pterocarpan scaffold: A natural lead molecule with diverse pharmacological properties. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017; 128: 219-236.

Silva MND, Ferreira VF, Souza MCBVD. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. Quim Nova. 2003; 26 (3): 407-416.

Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 2006; 22 (4): 168-174.

Specker G, Estrada D, Radi R, Piacenza L. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial Peroxiredoxin promotes infectivity in macrophages and attenuates Nifurtimox toxicity. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022; 12:749476.

Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, De Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TCM, Stoco PH, Murta SMF, Carvalho-Pinto CJD, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2008; 60 (1): 25-32.

Souza ROO, Crispim M, Silber AM, Damasceno FS. Glutamine Analogues Impair Cell Proliferation, the Intracellular Cycle and Metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. Molecules. 2020; 25 (7): 1628.

Souza-Lima Rde C, Barbosa MD, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento Ada S, Ferreira JM, Magalhães LK, Albuquerque BC, Araújo GA, Guerra JA. Outbreak of acute Chagas Disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical. 2013; 46 (4): 510-514.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, Souza WD. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Plos Negl Trop Dis. 2012; 6 (8): 1-13.

Tomás AM, Castro H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. Antioxidants & Redox Signaling. 2013; 19 (7): 696-707.

Torrice F, Gascón J, Ortiz L, Pinto J, Rojas G, Palacios A, Barreira F, Blum B, Schijman AG, Vaillant M, Strub- Wourgaft N, Pinazo MJ, Bilbe G, Ribeiro I. A Phase 2, Randomized, Multicenter, Placebo-Controlled, Proof-of-concept Trial of Oral Fexinidazole in Adults with Chronic Indeterminate Chagas Disease. Clinical Infectious Diseases. 2022; ciac579.

Tribute to P. I. Lutz: putting life on 'pause' - - molecular regulation of hypometabolism. *The Journal of Experimental Biology*. 2007; 210 (Pt 10): 1700-1714.

Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2014; 62 (1): 149-156.

Vargas A, Malta JMAS, Costa VMD, Cláudio LDG, Alves RV, Cordeiro GDS, Aguiar LMA, Percio J. Investigation of an outbreak os acute Chagas disease outside the Amazon region, in Rio Grande do Norte State, Brazil, 2016. *Cad. Saúde Pública*. 2018; 34 (1): e00006517.

Velásquez-Ortiz N, Ramírez JD. Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. *Researchin Veterinary Science*. 2020; 132: 448-461.

Vieira NC, Espindola LS, Santana JM, Veras ML, Pessoa ODL, Pinheiro SM, et al. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16 (4): 1676-1682.

Viotti R, Vigliano CA, Álvarez MG, Lococo BE, Petti MA, Bertocchi GL, Armenti AH. The Impact of Socioeconomic Conditions On Chronic Chagas Disease Progression. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(11):1224-1232.

Wrona M, Patel K, Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 38(2): 262-270.

Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*. 2019; 39 (1): BSR20180992.

Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and Cell Death. *Essays in Biochemistry*. 2013; 55: 105-117.

Zandbergen GV, Lüder CGK, Heussler V, Duszenko M. Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection?. *Trends Parasitology*. 2010; 26 (10): 477-483.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry*. 1997; 253(2): 162-168.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (7): 1051-1054

Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas Disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*. 2018; 184: 38-52.