

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

BRUNO HARTMANN

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPARASITÁRIO DE CLORIDRATO DE
N-GERANIL-1,2-DIAMINOETANO (GIB24) SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

PONTA GROSSA

2021

BRUNO HARTMANN

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPARASITÁRIO DE CLORIDRATO DE
N-GERANIL-1,2-DIAMINOETANO (GIB24) SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas referente à etapa de Defesa, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iriane Eger

PONTA GROSSA

2021

H333 Hartmann, Bruno
Avaliação do efeito antiparasitário de cloridrato de N-Geranyl-1,2-diaminoetano(GIB24) sobre *Trypanosoma cruzi* / Bruno Hartmann. Ponta Grossa, 2021.
72 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

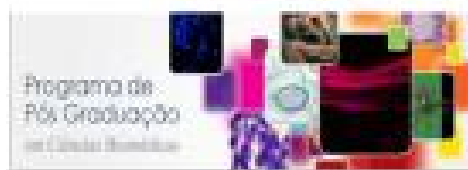
Orientadora: Profa. Dra. Iriane Eger.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Diaminas. 3. Etanodiamina. 4. Atividade tripanocida. 5. In vivo. I. Eger, Iriane. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. III.T.

CDD: 576



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, ATA N. 06/2021, DO MESTRANDO BRUNO HARTMANN REALIZADA NO DIA 27 DE AGOSTO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e sete dias de agosto de dois mil e vinte e um, às 09h, em conformidade com o Art.2º da Portaria Capes n.36 de 19 de março de 2020, em seção pública por vídeo conferência na plataforma Google Meet, sob a presidência da **Professora Dra. Iriane Eger** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando **Bruno Hartmann** na linha de pesquisa Bioquímica dos processos celulares, constituída pelos demais membros titulares: **Professor Dr. Airton Vicente Pereira (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Greicy Brisa Malaquias Dias (UFSC/SC)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Avaliação do efeito antiparasitário de cloridrato de N-geranil-1,2- diaminoetano (GIB24) sobre *Trypanosoma cruzi*”**. Encerrada a defesa e, após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **APROVADO** considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O acadêmico deverá entregar ao Programa a versão final da dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015. Para a obtenção do título de Mestre, a acadêmica terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Prof. Dra. Iriane Eger 1- (DEBIO - UEPG) - Presidente

Prof. Dr. Airton Vicente Pereira (DEFAR - UEPG) - Titular



Documento assinado digitalmente
Greicy Brisa Malaquias Dias
Data: 30/08/2021 14:59:03-0300
CPF: 311.287.168-52
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dra. Greicy Brisa Malaquias Dias (UFSC/SC) - Titular

Ponta Grossa, 27 de agosto de 2021.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente, o único fármaco disponível para o tratamento no Brasil é o benzonidazol (BZ), que apresenta várias limitações e efeitos adversos. A conhecida atividade tripanocida *in vitro* das diaminas, seu suposto mecanismo de ação sobre a biossíntese de poliaminas e a facilidade de sua síntese química incentivam a investigação de sua eficácia *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da etanodiamina GIB24 sintética contra *T. cruzi* (cepa Y). Inicialmente, foi avaliado o efeito *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, cujo valor de CI_{50} foi menor que 0,5 μM , sendo 20 vezes mais potente que o BZ (CI_{50} = 11,4 μM). GIB24 não foi citotóxico para células Vero E6, nas concentrações ativas, sendo pelo menos 180 vezes mais tóxico para o parasito do que para a célula hospedeira ($IS > 180$). Para determinar a dose ideal de GIB24 (*in vivo* I), camundongos BALB/c fêmeas foram infectados i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* e a partir do 5º dpi, os 5 diferentes grupos experimentais foram tratados uma vez ao dia pela via oral (gavagem) durante 5 dias consecutivos com: GIB24 100, 50 e 20 mg/kg/dia, benzonidazol 100 mg/kg/dia e veículo (DMSO 5%). Com base na redução da parasitemia, a dose de 50 mg/kg foi selecionada para os ensaios subsequentes. Para avaliar a eficácia tripanocida de GIB24 (*in vivo* II), três grupos de camundongos BALB/c machos infectados, foram tratados por gavagem com GIB24 50 mg/kg/dia, BZ 50 mg/kg/dia ou veículo, por um período de até 11 dias consecutivos com tratamento iniciado no 5º dpi. A atividade de GIB24 também foi avaliada, nas mesmas condições, em um grupo de camundongos Swiss fêmeas. A toxicidade *in vivo* também foi avaliada com os mesmos esquemas de tratamento, em animais não infectados, através da análise de alterações comportamentais, massa ponderal e marcadores séricos (ALT, CK e ureia). Um grupo de animais não manipulados (Naive) foi utilizado como controle. Nossos resultados mostraram que GIB24 a 50 mg/kg não suprimiu a parasitemia nem preveniu a mortalidade tanto em camundongos machos quanto fêmeas, ao contrário do observado no ensaio *in vivo* I. A administração de GIB24 por períodos superiores a 5 dias causou apatia, perda de peso, mortalidade e aumento dos níveis séricos de ALT. A toxicidade observada *in vivo* corrobora parcialmente com os resultados preditivos *in silico*, com GIB24 inserida na classe IV (não letal, mas potencialmente nociva) e DL_{50} de 700 mg/Kg. Portanto, os ensaios *in vitro* demonstraram que GIB24 foi mais potente que o BZ. Porém, nas condições experimentais avaliadas, não apresentou atividade tripanocida *in vivo* e foi tóxica em tratamento superior a 5 dias.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Diaminas; *Etanodiamina*; Atividade tripanocida; *In vivo*.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects around 7 million people worldwide. Currently, the only drug available for treatment in Brazil is benznidazole (BZ), which has several limitations and adverse effects. The known *in vitro* trypanocidal activity of diamines, their supposed mechanism of action on polyamine biosynthesis, and the ease of their chemical synthesis encourage investigation of their *in vivo* efficacy. The objective of this work was to evaluate the effect of synthetic ethanediamine GIB24 against *T. cruzi* (Y strain). First, the *in vitro* effect against intracellular amastigote forms of *T. cruzi* was evaluated, whose IC₅₀ value was less than 0.5 μ M, which is 20 times more potent than BZ (IC₅₀ = 11.4 μ M). GIB24 was not cytotoxic to Vero E6 cells in active concentrations, being at least 180 times more toxic to the parasite than to the host cell (SI>180). To determine an optimal dose of GIB24 (*in vivo* I), BALB/c mice were infected i.p. with 10⁴ *T. cruzi* blood trypomastigotes. Five days later, the 5 experimental groups were treated once a day orally (gavage) for 5 consecutive days with: GIB24 100, 50 and 20 mg / kg / day, benznidazole 100 mg/kg/day and vehicle (DMSO 5%). Based on the reduction in parasitemia, a dose of 50 mg/kg was defined for subsequent trials. To assess the trypanocidal efficacy of GIB24 (*in vivo* II), three groups of infected male BALB/c mice were treated by gavage with GIB24 50 mg/kg/day, BZ 50 mg/kg/day or vehicle, for a period of up to 11 consecutive days with treatment starting on the 5th dpi. The activity of GIB24 was also evaluated, under the same conditions, in a group of female Swiss mice. *In vivo* toxicity was also evaluated with the same treatment regimens, in uninfected animals, through the analysis of behavioral changes, weight mass and serum markers (ALT, CK and urea). A group of unhandled animals (naive) was used as a control. Our results showed that GIB24 at 50 mg/kg did not suppress the parasitemia or prevent mortality in both female and male mice, contrary to what was observed in the *in vivo* I assay. Administration of GIB24 for periods longer than 5 days caused apathy, weight loss, mortality and increased serum ALT levels. The toxicity observed *in vivo* partially corroborates the predictive results observed *in silico*, where GIB24 was classified in class IV (not lethal, but potentially harmful), and LD₅₀ of 700 mg/kg. Therefore, *in vitro* assays showed that GIB24 was more potent than BZ. However, it was ineffective and toxic in mice treated longer than 5 days.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Diamines; *Ethanediamine*; Trypanocidal activity; *In vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2 - Rota migratória da doença de Chagas da América Latina.....	18
Figura 3 - Distribuição de casos brasileiros de doença de Chagas aguda, segundo a provável forma de transmissão e ano de início de sintomas, no período de 2007 a 2020.....	19
Figura 4 - História natural da doença de Chagas.....	21
Figura 5 - Estrutura dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox, com destaque para os grupos nitro responsáveis pela atividade tripanocida.....	23
Figura 6 - Estrutura das poliaminas putrescina, espermidina e espermina.....	27
Figura 7 - Metabolismo de poliaminas em <i>T. cruzi</i>	29
Figura 8 - Estrutura química de GIB24.....	32
Figura 09 - Fluxograma do delineamento experimental proposto para o estudo.....	34
Figura 10 - Atividade tripanocida de GIB24 sobre formas amastigotas em células Vero E6.....	44
Figura 11- Avaliação da variação de peso antes e após cinco dias de administração oral de GIB24.....	45
Figura 12 - Curso da infecção da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> após quatro passagens em camundongos BALB/c, acompanhado por 15 dias pós infecção.....	46
Figura 13 - Avaliação inicial do efeito tripanocida <i>in vivo</i> de GIB24 e definição da melhor dose.....	47
Figura 14 - Avaliação da variação de peso antes e após nove dias de administração oral de GIB24 em camundongos não infectados.....	49
Figura 15 - Avaliação do efeito tripanocida <i>in vivo</i> de GIB24 em camundongos machos e fêmeas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Análise <i>in silico</i> das propriedades químicas de GIB24.....	41
Tabela 02 - Efeito de GIB24 e benzonidazol (BZ), após 48h de incubação, expresso como percentual de inibição e CI_{50} sobre formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) e Índice de Seletividade (IS) em relação à células Vero E6.....	43
Tabela 03 – Avaliação de parâmetros séricos em camundongos BALB/c fêmeas e tratados com GIB24. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de seis camundongos tratados com GIB24 em DMSO 5% em três doses e veículo por um período de 5 dias. ALT = Alanina aminotransferase; CK= Creatinoquinase.....	45
Tabela 04 – Avaliação de parâmetros séricos em camundongos Swiss machos não infectados e tratados com GIB24.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BZ	Benzonidazol
CC50	Concentração citotóxica de 50%
CI50	Concentração inibitória de 50%
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
dpi	Depois da infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GSH	Glutathione
HAI	Hemaglutinação indireta
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
i.p.	Intraperitoneal
IS	Índice de seletividade
Met	Metionina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NX	Nifurtimox
OMS	Organização mundial de saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PI	Percentual de inibição
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RPMI	Meio Roswell Park Memorial institute
SBF	Soro bovino fetal
SVS/MS	Sistema Nacional de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
TR	Tripanotona redutase
WHO	World health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
3.1.2 Ciclo de vida.....	14
3.2 Doença de Chagas.....	16
3.2.1 Epidemiologia e situação atual.....	16
3.2.2 Fases aguda e crônica da doença de Chagas e suas formas de diagnóstico..	19
3.3 Tratamento Da Doença De Chagas.....	23
3.4 Diaminas Como Moléculas Antiparasitárias: Atuação Em Moléculas Da Via De Poliaminas Em <i>T. cruzi</i>	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Composto e Fármaco Utilizados.....	32
4.3 Células.....	33
4.5 Análise <i>In Silico</i>	35
4.6 Avaliação Da Atividade Antiparasitária In Vitro.....	36
4.6.1 Ensaios de citotoxicidade em células VERO E6.....	36
4.7 Avaliação Da Toxicidade <i>In Vivo</i>	37
4.8 Avaliação Da Atividade Antiparasitária <i>In Vivo</i>	38
4.8.1 Readaptação da cepa Y no modelo murino.....	38
4.8.2 Avaliação da atividade antiparasitária <i>in vivo</i> I.....	38
4.8.3 Avaliação da atividade tripanocida <i>in vivo</i> II.....	39
4.9 Exame Parasitológico a Fresco.....	40
4.10 Análise Estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Avaliação <i>In Silico</i>	41
5.2 Atividade Tripanocida Frente a Formas Amastigotas Intracelulares.....	43
5.3 Avaliação Da Toxicidade <i>In Vivo</i>	44
5.4 Avaliação Da Atividade Antiparasitária <i>In Vivo</i>	46
5.4.1 Readaptação da cepa Y de <i>T. cruzi</i> ao modelo <i>in vivo</i>	46

5.4.2 Atividade tripanocida <i>in vivo</i> I.....	46
5.4.3 Atividade tripanocida e toxicidade <i>in vivo</i> II.....	48
5.3.4 Sobrevivência dos camundongos infectados no ensaio <i>in vivo</i> II.....	51
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase Americana ou Doença de Chagas (DC), descrita em 1909 por Carlos Chagas é uma doença parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que afeta de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, com estimativas de aproximadamente 10.000 óbitos todos os anos (COURA, 2020).

Após acometido pela enfermidade, o paciente chagásico tem apenas o Nifurtimox (Lampit®, Bayer) e o Benzonidazol (Rochagan®, Roche) como opções terapêuticas medicamentosas. Estes fármacos são utilizados desde a década de 1970 e possuem baixos índices de cura, cerca de 10%, na fase crônica da doença (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Na triagem de novos compostos bioativos, as moléculas da classe das diaminas têm ganhado destaque devido a conhecida atividade *in vitro* contra *T. cruzi*. As diaminas têm seu suposto mecanismo de ação sobre a biossíntese das poliaminas - um alvo terapêutico reconhecido, que aliado a característica de facilidade de síntese química do composto, tornam estas moléculas relevantes na investigação de novos compostos com atividade contra *T. cruzi* (YAMANAKA *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo moléculas de diaminas e grupamentos amina têm demonstrado significativo efeito antiparasitário em estudos *in vitro*, como por exemplo nos trabalhos com diaminas lipídicas (SALES JÚNIOR *et al.*, 2014), diaminas alifáticas (YAMANAKA *et al.*, 2013) e também *in vivo*, como as poliaminas e complexos poliamínicos (OLMO *et al.*, 2016); poliaminas macrocíclicas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2012) e poliamina tris(2-aminometil)amina (ESCOLANO *et al.*, 2019). Em estudos prévios, nosso grupo avaliou o potencial tripanocida de 32 diaminas inéditas, das quais sete foram mais potentes que o benzonidazol (BZ), com destaque para três (GIB10, GSC1 e TAS8) que apresentaram baixa toxicidade contra células de mamífero (DAFFARA *et al.*, 2014). Em um estudo anterior, nosso grupo também testou a etano-diamina GIB24 (na forma sintética), que demonstrou ser ativa contra *T. cruzi* em ensaios *in vitro* preliminares, com resultados promissores contra epimastigotas (CI₅₀ 3,33 µM) e amastigotas intracelulares (100% e 75% de inibição nas concentrações de 7,5µM e 2µM, respectivamente), sem causar citotoxicidade em células Vero (dados não publicados). Com base nesses dados, que indicaram essa

diamina como sendo a mais promissora, nosso grupo recebeu um novo lote de GIB24 para testar sua eficácia no modelo experimental *in vivo* da DC.

Dessa forma, diante dos resultados promissores e das características químicas das diaminas, assim como da carência de novos compostos para o tratamento da DC, avaliamos a atividade antiparasitária de cloridrato de n-geranil-1,2-diaminoetano (GIB24) contra *Trypanosoma cruzi* em ambos os modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade tripanocida da etanodiamina GIB24 sintética.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar *in silico* as propriedades químico-farmacológicas de GIB24;
- Determinar a citotoxicidade de GIB24 sobre células Vero E6;
- Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de GIB24 contra amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi* e estabelecer o índice de seletividade (IS);
- Avaliar a atividade tripanocida de GIB24 em camundongos infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda;
- Avaliar a toxicidade de GIB24 em camundongos saudáveis;
- Comparar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* de GIB24 com o fármaco de referência (benzonidazol).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Trypanosoma cruzi*

3.1.1 O parasita

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, e é o agente etiológico da tripanosomíase americana, também conhecida como doença de Chagas. Pertence ao reino Protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae (ZINGALES, 2012). Os organismos da classe Kinetoplastea tem por característica a presença de uma única mitocôndria alongada e ramificada, que contém em seu interior uma região que concentra o DNA mitocondrial, denominada de cinetoplasto (DE SOUZA, 1999).

Existem indícios de que a infecção humana pelo protozoário *T. cruzi* (*Schyzotripanum*) ocorre há pelo menos cinco mil anos antes da era comum, sendo a evidência de infecção humana mais antiga encontrada em múmias de 9.000 anos (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). No entanto, o ciclo enzoótico da DC existe há milhões de anos na natureza, como uma enzootia em animais silvestres que passou a ser transmitida ao homem acidentalmente quando este invadiu os ecótopos naturais (COURA, 2007).

Antes da presença humana nos ecótopos naturais, *T. cruzi* se encontrava restrito a situação silvestre, circulando entre o inseto vetor e os hospedeiros mamíferos, como marsupiais, roedores e edentados. O homem passou a fazer parte do ciclo epidemiológico de *T. cruzi* quando invadiu estes ecótopos, ocasionando mudanças em relação a disseminação do vetor (COURA, 2007).

Dessa forma, determinadas espécies de triatomíneos, como *Triatoma infestans*, *Rhodinus prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Panstrongilus megistus*, entre outros (MANDAL, 2014) passaram a coabitar as instalações humanas à medida que perderam suas fontes alimentares, principalmente devido às mudanças ambientais antropogênicas, colonizando os mais variados locais como buracos ou fendas em paredes e encontraram condições ideais de abrigo e oferta alimentar, o que favoreceu a difusão da doença transmitida entre animais domésticos e humanos e o estabelecimento de uma zoonose (COURA, 2007).

Contudo, a diversidade genética do parasita tem sido associada, em grande parte, com diferentes distribuições geográficas, ecologia e ao seu ciclo de transmissão e contribui para a complexidade biológica, epidemiológica e clínica da doença de Chagas (CEBALLOS; OLIVERA, 2019).

Desta forma, o parasita *T. cruzi* é um táxon composto por subpopulações de origem clonal, mas geneticamente muito diversificadas, sendo assim as linhagens de *T. cruzi* são categorizadas em seis principais linhagens genéticas denominadas unidades de tipagem discreta (DTU) TcI-VI. Essas diferentes cepas ou isolados deste parasito apresentam marcante variabilidade biológica, com diferentes taxas de multiplicação, tropismo tecidual e suscetibilidade ao quimioterápico (ZINGALES *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2002).

3.1.2 Ciclo de vida

O sucesso adaptativo de *T. cruzi* está relacionado a sua transmissão tecida em uma rede alimentar (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018) e ao seu ciclo de vida do tipo heteroxênico, constituído de ciclos silvestre, doméstico e peridoméstico, com uma interação dinâmica existente entre eles. São reservatórios naturais do *T. cruzi* uma série de mamíferos de pequeno e médio porte e o próprio homem e o ciclo envolve formas evolutivas variadas nos diversos hospedeiros vertebrados e no inseto vetor, hemípteros da subfamília Triatominae (MANDAL, 2014).

As diferentes formas morfológicas ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi* variam segundo características de flagelo e localização do cinetoplasto em relação ao núcleo. Sendo assim, três formas evolutivas são facilmente distinguíveis através de microscopia óptica, as formas tripomastigota, amastigota e epimastigota (MARTINS *et al.*, 2012).

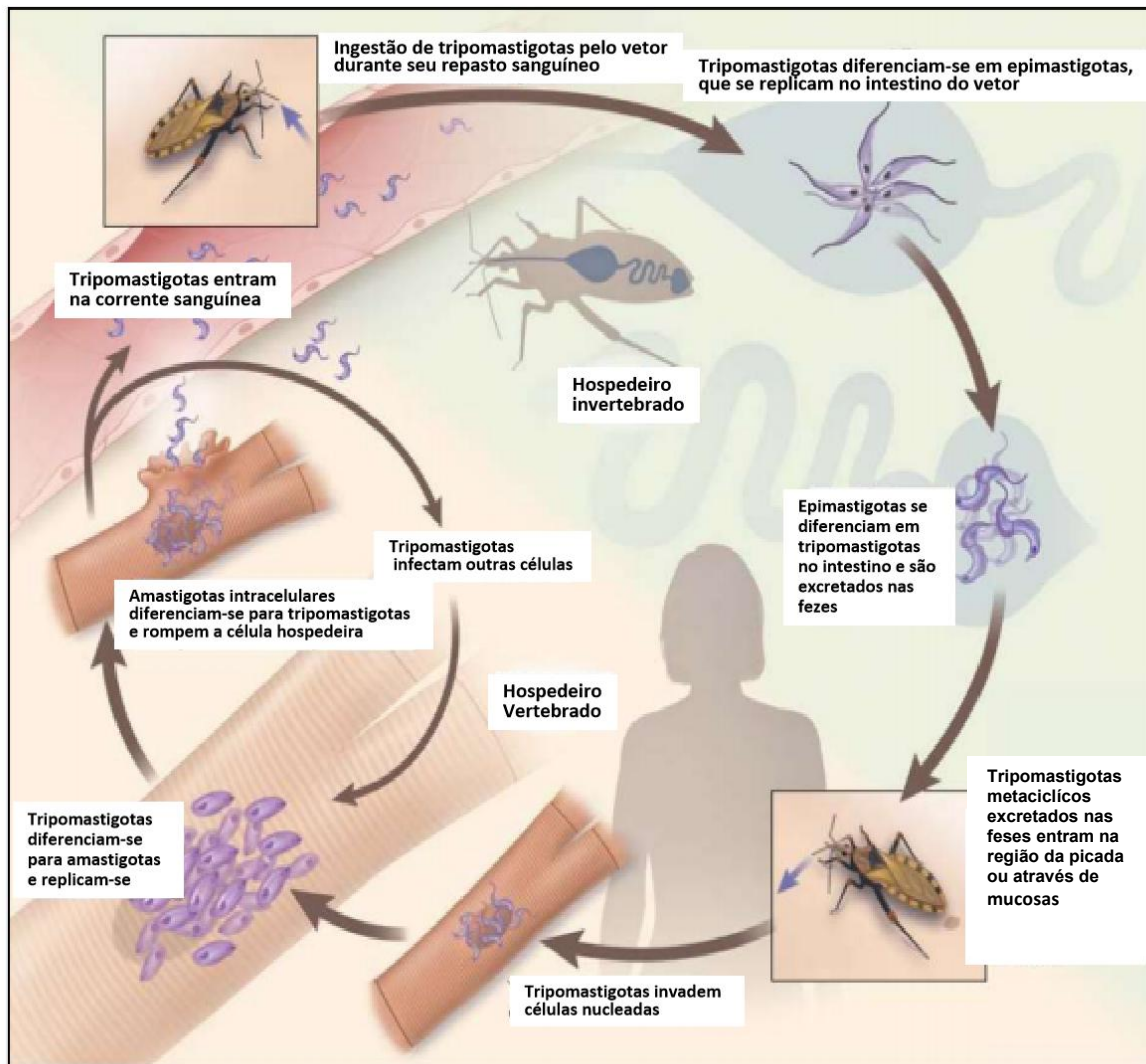
O ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 1) se inicia quando, durante o repasto sanguíneo, os insetos da subfamília Triatominae, ingerem as formas tripomastigotas do parasito presentes na circulação do hospedeiro mamífero. Tanto machos quanto fêmeas de triatomíneos, bem como todos os estádios ninfais do inseto, alimentam-se de sangue, o que potencializa a capacidade de transmissão de *T. cruzi* para os hospedeiros vertebrados (COURA, 2015).

No trato digestivo do inseto, o parasito assume uma forma epimastigota e após sucessivas divisões binárias, diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas. Estas

formas são eliminadas junto com as fezes e urina do triatomíneo durante um novo repasto sanguíneo e são infectantes para os hospedeiros vertebrados (TYLER; ENGMAN, 2001).

Após a penetração das formas tripomastigotas no local da picada ou por qualquer solução de continuidade no hospedeiro mamífero, *T. cruzi* é carreado para os vasos sanguíneos e linfáticos e pode invadir qualquer tipo de célula do organismo, sendo mais comum em macrófagos, fibroblastos, células musculares cardíacas e esqueléticas e nervos entéricos (EPTING; COATES; ENGMAN, 2010). Uma vez dentro da célula, o parasita passa a se multiplicar no citosol como amastigota, posteriormente se diferencia e rompe a célula, liberando as formas tripomastigotas, que irão repetir o processo de invasão, divisão e lise celular por várias semanas (TYLER; ENGMAN, 2001), resultando na elevada parasitemia, característica da fase aguda (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000). Os parasitos podem, então, infectar células vizinhas e mais distantes (difundidos através dos sistemas sanguíneo e linfático), ou ainda, serem novamente ingeridos pelo inseto vetor, completando o ciclo (TYLER; ENGMAN, 2001).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de: BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p.456–466, 2015.

Nota: Sem escala, cores fantasia.

3.2 Doença de Chagas

3.2.1 Epidemiologia e situação atual

Atualmente a doença de Chagas é reconhecida pela OMS como a infecção parasitária mais importante da América Latina, com os maiores índices de infecção presentes em 21 países latino americanos (DIAS, 2016). A DC faz parte da lista de doenças negligenciadas, sendo considerada uma das enfermidades de maior impacto global, especialmente nos países subdesenvolvidos (WHO, 2019).

As estimativas são de que aproximadamente 6 a 7 milhões de indivíduos estejam infectados no mundo, e que o Brasil possua uma margem entre 1,9 milhão a 4,6 milhões de casos da doença, 1,0 a 2,4% da população (SIMOES *et al.*, 2018), com cerca de 10.000 mortes anualmente e com cerca de 1.190 notificações de casos agudos (WHO, 2019), sendo a maioria na região norte do país (SVS/MS, 2020).

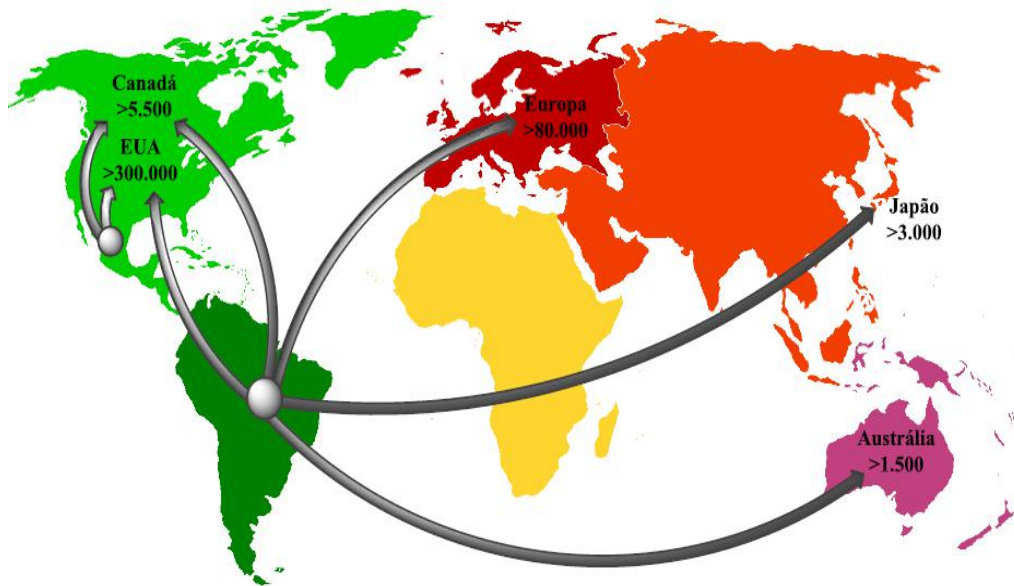
A forma natural de transmissão em humanos ou em outros vertebrados é a do tipo vetorial, onde a infecção acontece pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de triatomíneos infectados por *T. cruzi* durante seu repasto sanguíneo. Porém, outras vias de transmissão também são possíveis, como por transfusão sanguínea, por via placentária, pela via oral através de alimentos contaminados com o parasito e, esporadicamente, por transplantes de órgãos ou por acidentes em laboratório (COURA, 2015).

Em 2006 o Brasil foi considerado livre da transmissão da DC pelo vetor *Triatoma infestans*, devido ao controle químico de triatomíneos domiciliados. Também houve um aprimoramento da vigilância e triagem de doadores de sangue, tecidos e órgãos. Essas ações conjuntas diminuiriam expressivamente o número de casos agudos da DC no país, embora a transmissão vetorial não tenha sido completamente interrompida em todo o território (SALVATELLA; IRABEDR; CASTELLANOS, 2014).

No entanto, mesmo apesar de décadas de esforços e iniciativas de controle, que reduziram a incidência de DC no continente americano, há o potencial de reemergência ou emergência da doença, atrelado a um grande número de indivíduos infectados diagnosticados em populações migrantes. Estes indivíduos, podem servir de fonte alimentar para o vetor, tornar-se doadores de sangue ou doadores de órgãos, em países onde não há triagem. E ainda podem transmitir a doença verticalmente (infecções congênitas), perpetuando a transmissão da DC para outros continentes e países não endêmicos (BONNEY, 2014).

Desta forma, a doença passou a ser encontrada com maior frequência em países como Estados Unidos, Canadá, países do continente europeu e alguns países do Pacífico Ocidental nos últimos anos, conforme pode ser observado nos índices da figura 2 (COURA, 2014).

Figura 2 - Rota migratória da doença de Chagas da América Latina

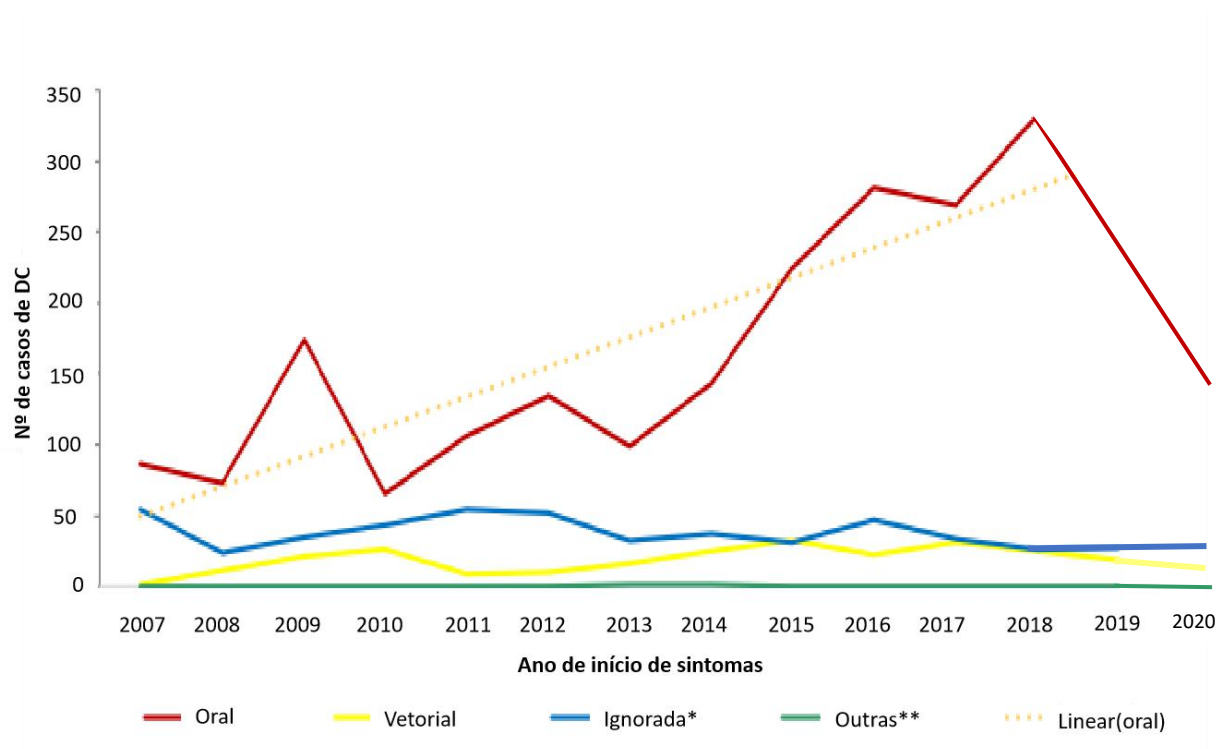


Fonte: Adaptado de: COURA, J. R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, n.7301, p. 6-7, 2020.

Além destes fatores, mudanças em relação ao cenário epidemiológico atual são observadas ao decorrer dos últimos 15 anos, principalmente em relação ao perfil de transmissão da doença. Conforme pode ser observado na figura 3, a ocorrência sistemática do aumento de casos relacionados à transmissão oral é preocupante, tanto pela sua associação com surtos da doença e pela gravidade clínica devido ao maior inóculo de parasitos, fator que também é observado nos casos de transmissão transfusional (SMVS, 2020).

A transmissão de forma oral está associada a sintomas mais severos na fase aguda inicial da doença, podendo levar a óbito em cerca de 33% dos casos, sendo responsável por grande parte dos índices de mortalidade de crianças durante a fase aguda sintomática (FILIGHEDDU *et al.*, 2017). Atualmente, a via oral responde pela quase totalidade dos casos novos ocorridos na última década, incidindo na região amazônica e em especial no estado do Pará (SMVS,2020).

Figura 3 - Distribuição de casos brasileiros de doença de Chagas aguda, segundo a provável forma de transmissão e ano de início de sintomas, no período de 2007 a 2020



Fonte: Adaptado de: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. Boletim Epidemiológico**. 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

3.2.2 Fases aguda e crônica da doença de Chagas e suas formas de diagnóstico

A DC tem duas fases consecutivas ao longo do seu curso de infecção, aguda e crônica. Na fase aguda, que ocorre durante as primeiras semanas ou meses após a infecção, a doença é frequentemente subclínica e não diagnosticada, pois os pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos.

As manifestações podem ser variáveis ocorrendo febre, de observação frequente, diretamente relacionada com o grau de parasitemia e de regra com a gravidade do caso, mal-estar, hepatoesplenomegalia, edema de pele denominado chagoma, nódulo inflamatório no local da picada do triatomíneo, ou edema de uma ou ambas as pálpebras (denominado sinal de Romaña, uma resposta de sensibilização à picada do triatomíneo) (CHADALAWADA *et al.*, 2020). Esta fase da doença é caracterizada pela alta parasitemia, geralmente de curto período (entre seis e oito semanas), onde do ponto de vista laboratorial o diagnóstico pode ser realizado

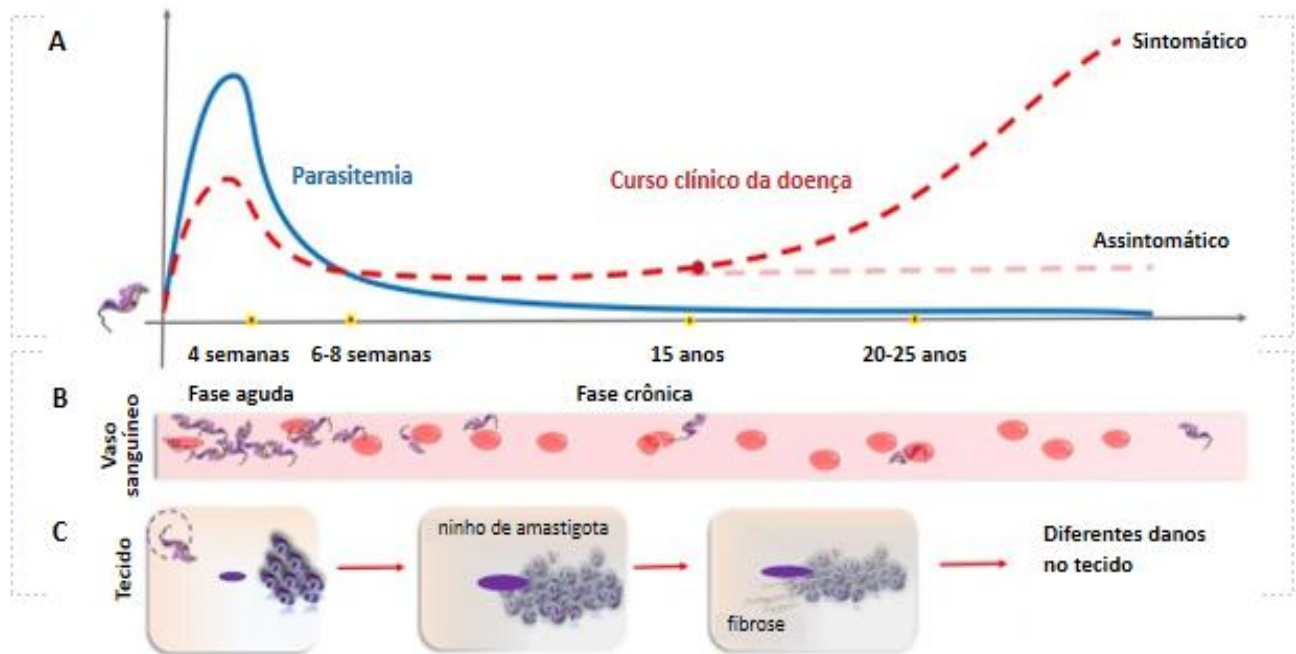
através da demonstração do parasita no sangue por meio de exame direto, assim como por meio de métodos sorológicos, sendo IgM o principal marcador (BRENER, 2000).

Nas áreas onde a doença de Chagas é endêmica a gravidade das crises agudas é maior em crianças, tendo o envolvimento do miocárdio na maioria das vezes, e com estimativas de taxas de letalidade de 2% a 7%. A gravidade da doença de Chagas aguda está diretamente relacionada com uma alta carga parasitária, como ocorre nos casos de transmissão oral, e apresenta-se clinicamente mais exuberante em menores de dois anos, idosos e imunossuprimidos (DIAS, 2016).

A fase aguda é seguida de uma fase crônica, podendo esta apresentar uma forma indeterminada (assintomática) apresentando apenas lesões inflamatórias mínimas e servindo como reservatório para o protozoário. Dois terços dos pacientes infectados por *T. cruzi* permanecem nesta fase (ANDRADE, 1999). Cerca de um terço dos casos indeterminados podem evoluir para formas sintomáticas, como a forma cardíaca (cardiomegalia), digestiva (megaesôfago e megacólon) ou cardiodigestiva (ambas complicações). Menos de 5% dos casos desenvolvem a forma neurológica da doença (MANDAL, 2014). Os parasitos que resistem ao sistema imunológico do hospedeiro vertebrado se alojam em alguns órgãos, propiciando a cronificação da doença.

Embora a parasitemia não seja detectável por técnicas de microscopia direta, o diagnóstico pode ser realizado por hemocultura, sorologia ou PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Muitas questões relativas ao papel funcional da autoimunidade na patogênese da doença de Chagas ainda permaneçam sem resposta, como o desenvolvimento de respostas autoimunes durante a fase crônica que ocorre em alguns indivíduos sendo provável que tanto os danos mediados pelo parasita quanto a imunidade e autoimunidade específicas contribuam para a progressão da doença (BONNEY, 2014).

Figura 4 - História natural da doença de Chagas



Fonte: Adaptado de: BONA, E. de; LIDANI, K. C. F.; BAVIA, L.; OMIDIAN, Z.; GREMSKI, L. H.; SANDRI, T. L.; DE MESSIAS REASON, I. J. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v.9, p.1-8, 2018.

A maioria dos casos agudos não tratados pode evoluir para a forma crônica indeterminada, a qual consiste na presença da infecção, comprovada por testes sorológicos ou parasitológicos indiretos, sem sintomatologia clínica associada. Os pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença possuem baixa morbidade e excelente prognóstico (PRATA, 2001). No entanto a doença pode evoluir para a forma crônica sintomática, mesmo após anos de silenciamento, na qual cerca de 30% dos pacientes apresentam manifestações clínicas significativas, associadas à condição de morbidade ou mortalidade (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A cardiopatia chagásica crônica constitui forma clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi* resultando de dano miocárdico progressivo consequente a incessante miocardite fibrosante (MARTINEZ *et al.*, 2019). A insuficiência cardíaca se desenvolve em até 30% dos pacientes infectados com *T. cruzi*, e os resultados são

agravados em pacientes com insuficiência cardíaca decorrente de outras causas (NÓBREGA, 2019). Embora se espere que tratamentos comprovadamente eficazes em outros tipos de insuficiência cardíaca possam ser utilizados no tratamento de pacientes com causa tripanossomal, características específicas da cardiomiopatia chagásica, como a alta prevalência de doenças do sistema de condução, limitam o uso de terapias convencionais (NÓBREGA, 2019). Dos indivíduos acometidos pela fase crônica, 15% a 20% desenvolverão alteração de motilidade, absorção e secreção no trato digestivo, especialmente no cólon e no esôfago; acima de 10% dos pacientes desenvolverão uma forma mista, ou seja, cardíaca e digestiva (PRATA, 2001; RASSI; RASSI; RASSI, 2007).

O transplante cardíaco é uma hipótese cogitada para pacientes com DC com cardiomiopatia grave, no entanto, a reativação da infecção é uma grande preocupação e a doença pode afetar seriamente os receptores de transplante, decorrente da terapia imunossupressora (CEBALLOS; OLIVERA, 2019). A reativação da DC tem sido relatada em hospedeiros imunocomprometidos, entre eles pacientes infectados pelo HIV e pacientes com câncer. Nos países onde a DC é endêmica, a taxa de coinfeção HIV/*T. cruzi* varia de 1,3% a 7,1%, enquanto que no Brasil a estimativa é de 1,3%. De fato, o *T. cruzi*, como outros organismos infecciosos, é um protozoário oportunista nesses pacientes (STAUFFERT *et al.*, 2017).

Desta forma, diante do alto potencial de morbimortalidade da doença, estimativas recentes indicam que a DC é responsável por ~ 550.000 anos de vida ajustados por incapacidade (DALY), uma medida que captura tanto a mortalidade prematura (~ 12.000 mortes por ano) quanto as perdas de saúde em casos não fatais (STANAWAY; ROTH, 2015) com a forma crônica sendo a mais importante da doença de Chagas, principalmente devido à sua frequência e severidade.

Neste sentido, um grande avanço conquistado em 2020 foi a inserção da fase crônica como notificação compulsória nacionalmente (Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020), visto que, anteriormente, somente a fase aguda estava incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e Imediata, segundo a Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017 (SNVS, 2020).

Porém, muitas perguntas ainda permanecem em relação a influência da cepa do parasito e o tropismo tecidual, a carga parasitária, o tempo de infecção e a exposição à reinfeção, bem como as características genéticas do hospedeiro e os fatores relacionados à resposta imune. Desta forma, este conjunto de fatores tem

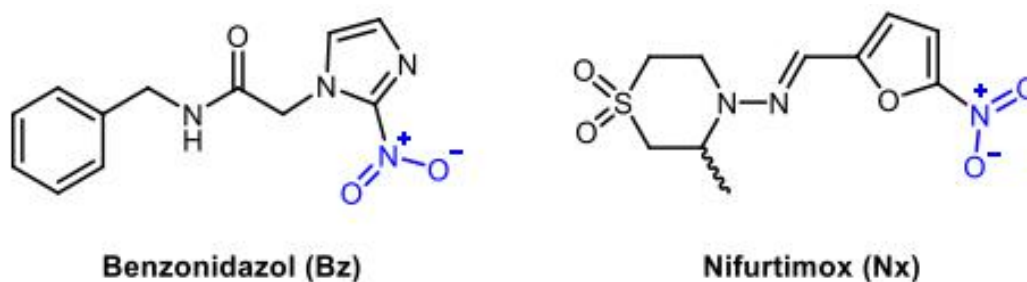
sido sugestivos como determinantes na evolução do paciente chagásico nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas (BONNEY, 2014).

3.3 Tratamento Da Doença De Chagas

O tratamento da DC objetiva a erradicação da infecção, a prevenção do aparecimento de lesões e o agravamento e progressão de lesões já presentes. Praticamente, desde a descoberta da DC, seu tratamento vem sendo investigado e pode-se dividir o desenvolvimento da pesquisa da terapêutica da DC em duas fases, com o divisor delas na década de 70, quando foram descritos os fármacos nifurtimox e benzonidazol, cujas estruturas são mostradas na figura 5 (URBINA, 2010).

Atualmente, o único medicamento disponível na maioria dos países latino-americanos, inclusive no Brasil, é o benzonidazol (BZ). Produzido inicialmente pela farmacêutica Roche (Rochagan® e Radanil®), o BZ passou a ser fabricado exclusivamente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), Brasil, e pelo laboratório privado Elea (Abarax®), Argentina (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Figura 5 - Estrutura dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox, com destaque para os grupos nitro responsáveis pela atividade tripanocida



Fonte: Adaptado de: BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v.156, p. 1-16, 2016.

O mecanismo de ação de ambos envolve a produção de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Neste mecanismo o grupo nitro (R-NO₂) é reduzido a um grupo amino (RNH₂) por nitroredutases (NADPH-citocromo P-450 redutase) com formação de radicais livres intermediários (R-NO₂⁻) (MAYA *et al.*, 2007). A atividade destes compostos se dá pela formação de ânion superóxido O₂⁻ e H₂O₂ que na presença de Fe³⁺ formam radicais livres, hidroxilas (OH⁻), os quais se ligam

covalentemente aos lipídeos, proteínas e DNA que são a causa do efeito antiparasitário (MAYA *et al.*, 2007).

Tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox foram descritos apenas para uso no tratamento da manifestação aguda da DC, porém ambos vem sendo utilizados também na fase crônica inicial da doença (URBINA, 2010). Entretanto, nenhum destes quimioterápicos atende totalmente aos preceitos para um fármaco eficiente de acordo com os critérios da OMS (COURA, 2007).

As reações adversas ao uso do medicamento BZ estão entre uma das principais complicações do uso do medicamento. Estudos de revisão sobre a terapêutica utilizando BZ mostram que a taxa de reações adversas pode chegar a 38% e o abandono do tratamento devido a essas reações tem uma variação de 6,4% a 13,4% (MOTA *et al.*, 2019).

Os efeitos colaterais leves a moderados registrados em ensaios clínicos randomizados de terapêutica do BZ avaliados no ensaio TRAENA, mostram dados de 352 participantes tratados com BZ e 357 participantes tratados com placebo. As reações adversas nos pacientes tratados com BZ consistiram em reações cutâneas, como prurido (23,9%), erupção cutânea leve (36,4%) e erupção cutânea moderada (21,3%). Em relação aos efeitos colaterais graves, estudos incluídos na revisão relatam a ocorrência de hepatite tóxica, artrite, neuropatia periférica, linfadenopatia, edema, febre, reações cutâneas graves e intolerância gastrointestinal grave entre os participantes durante e após o tratamento. Sendo que 25,3% dos 352 participantes que receberam BZ abandonaram este tratamento em comparação com 2,0% dos participantes que receberam placebo (VILLAR *et al.*, 2002).

A dose diária para o tratamento adulto é de 5 a 7 mg/kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas tomadas, para crianças, o esquema terapêutico recomendado é de 5 a 10 mg/kg/dia, durante 60 dias consecutivos, fracionando-se a dose diária em duas ou três tomadas antes da alimentação (DIAS, 2016). No Brasil, o tratamento em adultos é realizado através do comprimido de liberação imediata de 100 mg e em crianças com o comprimido de 12,5 mg de BZ, ambos produzidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde (DAVANÇO, 2015).

Estudos clínicos foram realizados acerca do tratamento com BZ e o Nx, e tem demonstrado que a eficácia terapêutica varia de acordo com a dose e com o tempo

de tratamento, fase da doença, idade e origem geográfica do paciente, bem como com a metodologia utilizada para verificação da cura (MOSCATELLI *et al.*, 2019).

Porém, os resultados demonstram que, quanto mais cedo, é realizado o diagnóstico e iniciado o tratamento, maiores as chances de cura parasitológica. Em um acompanhamento parasitológico e sorológico realizado em uma grande coorte de bebês e crianças residentes na Cidade de Buenos Aires, Argentina, área não endêmica para DC, onde os indivíduos foram principalmente infectados por via congênita, e tratados com BZ mostrou que a maioria das crianças menores de 2 anos tratadas (74,3%) tornou-se rapidamente negativa para *T. cruzi*, enquanto que crianças maiores de 2 anos apresentaram menor taxa de conversão para PCR negativo durante o tratamento. Esses pacientes eram assintomáticos e sem envolvimento cardiológico no momento do diagnóstico e tratamento, e durante o período de acompanhamento de 3 anos, não foram observadas novas lesões cardiológicas (MOSCATELLI *et al.*, 2019).

Em contrapartida, outros estudos envolvendo pacientes com a forma crônica revelam índices de cura menores. Em um estudo realizado por Morillo e colaboradores (2015), onde os pacientes, apresentavam pelo menos dois testes sorológicos positivos para *T. cruzi* e com evidências de cardiomiopatia chagásica, observou-se que a taxa de negatificação para PCR foi de apenas 33,5% ao final do tratamento e 46,7% 5 anos após o tratamento. As taxas de cura após tratamento também foram variáveis de acordo com a região geográfica, confirmando que *T. cruzi* é uma espécie extremamente heterogênea, com extensa variação natural na suscetibilidade ao BZ e que a variabilidade genética dos pacientes tem participação na resposta ao tratamento (MORILLO *et al.*, 2015).

Além disso, a resistência natural do *T. cruzi* aos derivados nitroheterocíclicos também já foi demonstrada (NOGUEIRA *et al.*, 2009). E há evidências que o tratamento a longo prazo com BZ pode originar mutagênese em todo o genoma em *T. cruzi* e resultar em alterações fenotípicas que incluem o desenvolvimento de resistência ao próprio medicamento e também a múltiplos fármacos.

Em *T. cruzi*, sob a seleção de BZ, os efeitos combinados de metabólitos eletrofílicos de drogas e deficiências no reparo do DNA, que podem surgir no início do processo, também podem atuar em conjunto para criar um ambiente hipermutagênico que impulsiona o desenvolvimento de resistência aprimorada e outras alterações fenotípicas. Essa atividade altamente mutagênica dos metabólitos

do BZ em *T. cruzi* indica a necessidade de vigilância quando BZ for usado em terapia combinada com outros medicamentos (CAMPOS *et al.*, 2017).

Outro ponto importante, que ainda está em discussão é a eficácia do tratamento antiparasitário com BZ em indivíduos chagásicos crônicos portadores da forma cardíaca grave, já que não há evidências, até o momento, de benefícios clínicos na evolução destes pacientes. Uma vez que as complicações cardíacas crônicas já estão estabelecidas, o uso de BZ não mostra redução significativa da deterioração clínica cardíaca, e a eficácia em pacientes adultos em fase crônica sem cardiomiopatia é discutível (MORILLO *et al.*, 2015).

Uma revisão de Villar e colaboradores (2002), comparando o resultado de coortes de indivíduos com infecção crônica por *T. cruzi*, expostos ao tratamento com NX e BZ versus placebo ou nenhum tratamento, mostrou que para as populações do Brasil e da Venezuela não há diminuição de anormalidades eletrocardiográficas e há aumento do risco de eventos de progressão de cardiomiopatia chagásica crônica. O tratamento etiológico com BZ em pacientes com cardiomiopatia chagásica estabelecida reduziu significativamente a detecção do parasita, mas não reduziu significativamente a deterioração clínica cardíaca, ao longo de cinco anos de acompanhamento (VILLAR *et al.*, 2002).

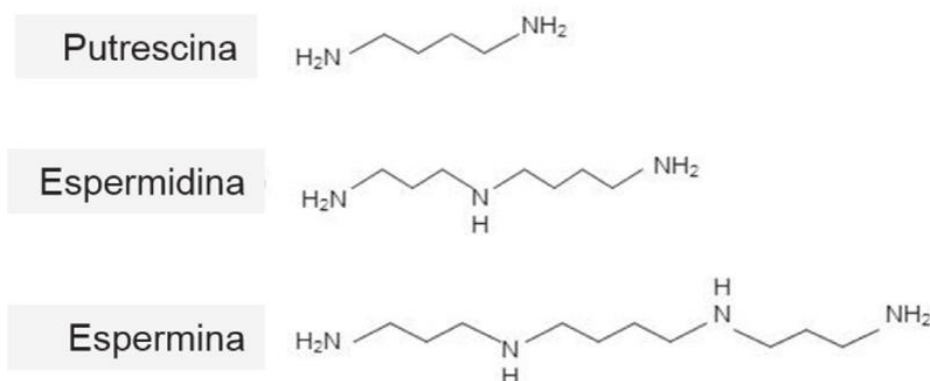
Apesar da baixa eficácia e da intensidade dos efeitos colaterais do NX e do BZ, estes são os únicos fármacos até hoje disponíveis para o uso clínico (RIBEIRO *et al.*, 2020). Contudo, a pesquisa por novos fármacos para o tratamento da DC tem sido continuamente explorada nas últimas décadas e, assim, vias metabólicas têm sido elucidadas e estudadas com objetivo de identificar novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento racional de novos compostos ativos. Dentre essas vias, destaca-se como alvo promissor, a via de biossíntese das poliaminas, que será destacada, pois representa um alvo de ação em potencial das diaminas, objeto do presente estudo.

3.4 Diaminas Como Moléculas Antiparasitárias: Atuação Em Moléculas Da Via De Poliaminas Em *T. cruzi*

As poliaminas podem ser definidas como aminas com duas ou três cadeias alifáticas, conectadas por átomos de nitrogênio. Estas moléculas são polications orgânicos de baixo peso molecular, as quais tem sua biossíntese a partir de precursores de aminoácidos (MORGAN, 1999). Como exemplo de poliaminas

naturais predominantes na maioria das células, temos as moléculas putrescina, espermidina e espermina (Figura 6). Estas poliaminas são consideradas essenciais, para biossíntese macromolecular, sobrevivência, proliferação e diferenciação celular normal tanto em células eucarióticas como em células procarióticas (ROBERTS; ULMAN, 2017).

Figura 6 - Estrutura das poliaminas putrescina, espermidina e espermina



Fonte: Adaptado de: WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 289-297, 1997.

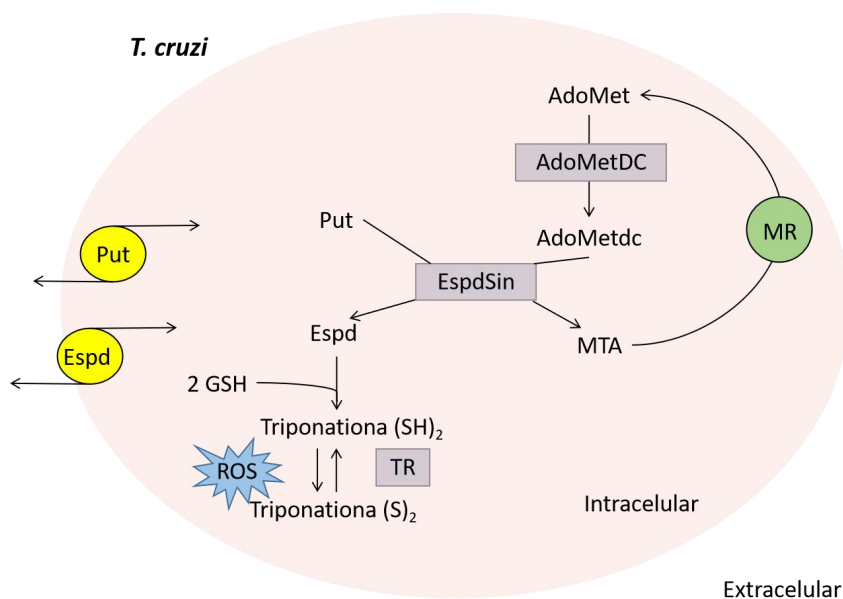
As poliaminas são essenciais para o crescimento celular e, portanto, sua biossíntese tem sido estudada por ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, que possam atuar na quimioterapia de doenças proliferativas. Um dos exemplos dessa abordagem é a quimioterapia para alguns tipos de câncer, onde o papel das poliaminas na migração/metástase celular vem sendo explorado em combinação com inibidores da via biossintética e inibidores do transporte de poliaminas (CASERO, 2018). De maneira semelhante, o número de estudos relacionados à síntese e função das poliaminas em parasitas protozoários vem crescendo desde os primeiros trabalhos no campo do câncer (PHILIPS, 2018).

O metabolismo das poliaminas em tripanosomatídeos (Figura 7) é constituído de diferentes etapas e está restrito à algumas enzimas, em comparação com a via em células de mamíferos (WILLERT; PHILLIPS, 2012). Diferentemente de outros protozoários e das células de mamíferos, *T. cruzi* é auxotrófico para as poliaminas, devido à falta de ornitina descarboxilase (etapa limitante na síntese eucariótica de putrescina) (CARRILLO *et al.*, 1999). Portanto, a disponibilidade intracelular de

putrescina em *T. cruzi* depende exclusivamente dos processos de transporte, sendo *T. cruzi* incapaz de sintetizar putrescina pela via de novo, devida a ausência de mecanismos de interconversão (REIGADA *et al.*, 2016). No nível molecular, o transportador da poliamina TcPAT12 foi descrito e caracterizado e consta no banco de dados do genoma de *T. cruzi*. O TcPAT12 é até agora o único transportador de poliamina validado funcionalmente no parasita (REIGADA *et al.*, 2019).

Embora *T. cruzi* não sintetize poliaminas, estas moléculas são cruciais para o parasita, particularmente no processo de internalização das formas tripomastigotas em pelo menos alguns tipos celulares e na progressão da infecção (CARRILLO *et al.*, 1999). Há evidências de que as poliaminas são essenciais para crescimento e sobrevivência celular, como por exemplo na inibição da fragmentação do DNA e restauração da proliferação de parasitas expostos ao soro humano quando na presença de concentrações variadas das poliaminas espermidina e putrescina (PIACENZA *et al.*, 2001).

Outro importante papel das poliaminas em *T. cruzi*, diz respeito ao seu papel no metabolismo oxidativo do parasita e implicações nos seus mecanismos de defesa antioxidantes. Reigada e colaboradores (2016), mostraram que as poliaminas espermina e a espermidina protegem as membranas de epimastigotas de *T. cruzi*, contra a lipoperoxidação induzida por peróxido de hidrogênio ou nifurtimox, *in vitro* e *in vivo*. Além disso, a ação antioxidante pode contribuir para a sobrevivência e proliferação celular, protegendo os parasitas dos metabólitos tóxicos de oxigênio aos quais são continuamente expostos (REIGADA *et al.*, 2016). A relação entre as poliaminas e a proteção ao estresse oxidativo no parasita se deve ao fato de que a molécula espermidina, produto da biossíntese das poliaminas, é um componente primordial para formação da tripanotiona e conseqüentemente na formação do sistema tripanotiona redutase (Figura 7) (SEGUEL *et al.*, 2016).

Figura 7 - Metabolismo de poliaminas em *T. cruzi*

Fonte: Adaptado de: MÜLLER, S.; COOMBS, G. H.; WALTER, R. D. 'Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy', **Trends in Parasitology**, v.17, p. 242–249, 2001.

Nota: Abreviações: Put: putrescina; Espd: Espermidina; GSH: Glutathiona; TR: Tripanotiona redutase; ROS: Espécies reativas de oxigênio; AdoMet: Sadenosilmetionina; AdoMetDC: S-adenosilmetionina decarboxilase; AdoMetdc: S-adenosilmetionina decarboxilada; MR: Via de reciclagem de metionina; EspdSin: Espermidina sintase; MTA: metiltioadenosina.

Dentre a classe de moléculas que apresentam efeitos antiparasitários contra *T. cruzi* e que interferem na biossíntese de poliaminas e suas moléculas associadas, a exemplo da enzima TR, estão as diaminas, que podem atuar de forma seletiva mantendo a molécula de tripanotiona em seu estado reduzido, ocasionando a morte do parasita (YAMANAKA *et al.*, 2013; DEL OLMO *et al.*, 2016; SALES JUNIOR, 2014; MARTÍN-ESCOLANO, 2019).

As diaminas possuem importantes propriedades químicas, como a sua solubilidade, tanto em meio orgânico, onde irão prevalecer as interações hidrofóbicas com os carbonos metilênicos, como em meio aquoso. Em pH fisiológico apresentam-se protonadas, prevalecendo as interações hidrofílicas características dessas que favorecem sua absorção e consequente disponibilidade intracelular (MENDONÇA, 2009).

Além disso, os átomos de nitrogênio das diaminas atuam como nucleófilos pela doação de um par de elétrons para um reagente eletrofílico, em reações ácido base, alquilação, acilação e substituição eletrofílica aromática (SOLOMONS;

FRYHLE, 2006). Essa propriedade das diaminas possibilita o emprego em síntese orgânica como blocos construtores de vários compostos biologicamente ativos (GUIGEN *et al.*, 2006).

Desta forma, devido a facilidade de biossíntese e promissora atividade biológica, diversos trabalhos se propõem a investigar a bioatividade de diaminas, bem como seu acoplamento a outras substâncias. Benítez e colaboradores (2016) observaram que os derivados de 6-amilpirido[2,3-d] pirimidina-2,7-diamina são inibidores moderados da tripanotona sintase de *T. cruzi*, a qual catalisa a ligação glutatona e espemidina formando a tripanotona, e, portanto, essencial para o sistema redox de tripanosomatídeos.

A atividade tripanocida das diaminas também já foi relatada em outros trabalhos. Sales Júnior e colaboradores (2014) ao avaliarem a atividade de diaminas lipídicas contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, encontraram atividade em concentrações de 2,46 a 18,41 μM , observando um aumento de aproximadamente 10x em relação à atividade encontrada contra formas tripomastigotas sanguíneas. De forma semelhante, Yamanaka e colaboradores (2013) observaram que diaminas alifáticas ativas contra *T. cruzi* foram, em sua maioria, mais ativas que o benzonidazol tanto em formas epimastigotas quanto em amastigotas intracelulares, sem causar citotoxicidade em células de mamífero.

Outros compostos derivados de aminas também têm sido identificados como compostos promissores em relação a atividade tripanocida em triagens no modelo *in vivo* durante a infecção por *T. cruzi*, particularmente em camundongos BALB/c, onde o tratamento foi realizado com uso dos compostos tetraaminas, os quais induziram uma redução notável na reativação da parasitemia após imunossupressão e também ocasionaram taxas curativas de 50%. Os mesmos autores também mostraram que a tetraamina é um potente inibidor de TR (OLMO *et al.*, 2016).

Em estudos prévios, nosso grupo avaliou o potencial tripanocida de 32 diaminas inéditas, das quais sete foram mais potentes que o benzonidazol (BZ), com destaque para três (GIB10, GSC1 e TAS8) que apresentaram baixa toxicidade contra células de mamífero (DAFFARA *et al.*, 2014). Em um estudo anterior, nosso grupo também testou etano-diamina (na forma sintética) (GIB24), que demonstrou ser ativa contra *T. cruzi* em ensaios *in vitro* preliminares, com resultados promissores contra epimastigotas (CI_{50} 3,33 μM) e amastigotas intracelulares (100% e 75% de inibição nas concentrações de 7,5 μM e 2 μM , respectivamente), sem causar citotoxicidade em

células Vero (dados não publicados). Com base nesses dados, que indicaram essa diamina como sendo a mais promissora, nosso grupo recebeu um novo lote de GIB24 para testar sua eficácia no modelo experimental *in vivo* da DC.

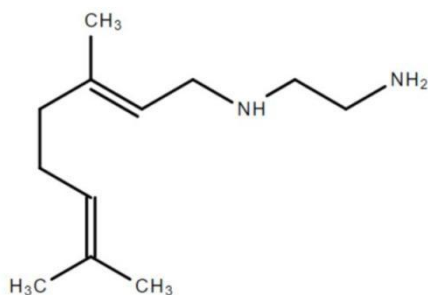
Dessa forma, diante desses resultados preliminares promissores, das características químicas das diaminas, dos relatos da ação das diaminas sobre o sistema peculiar e exclusivo de detoxificação dos tripanosomatídeos, assim como da carência de novos compostos para o tratamento da DC, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* e *in vivo* da etano-diamina GIB24 (na forma sintética).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Composto e Fármaco Utilizados

A N-geranil-1,2diaminoetano, GIB24 (Figura 8) foi sintetizada e fornecida pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), de Minas Gerais. O segundo lote recebido foi novamente testado *in vitro*, para confirmar sua atividade e a reprodutibilidade dos resultados prévios, antes de ser testado *in vivo*. O composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Alemanha) a 100 mM para os ensaios *in vitro* e estocado a -20°C até o uso. Para os ensaios *in vivo* GIB24 foi solubilizada a 10 mg/ml em PBS-DMSO 5% ou em água destilada estéril e estocada a 4°C por um período máximo de duas semanas.

Figura 8 - Estrutura química de GIB24



Fonte: DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Report**, p. 42-71, 2016.

Como controle, foi utilizado o benzonidazol 2-nitro-imidazol-(N-benzil-2-nitro-1-imidazoleacetamida) (Sigma) (Figura 5), fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas.

O benzonidazol (Bz) foi solubilizado em DMSO (*Merck, Germany*) a 100 mM para os ensaios *in vitro* e a 10 mg/ml em água-DMSO 5% para os ensaios *in vivo* e armazenado a -20° C até o uso. Alternativamente, o benzonidazol também foi solubilizado em Tween 80 a 3% em água destilada estéril.

4.2 Parasito

O composto foi avaliado frente à cepa Y de *T. cruzi*, isolada de caso humano agudo no Brasil (SILVA; NUSSENWEIG, 1953), a qual apresenta média resistência *in vivo* aos nitroimidazóis (FILARDI; BRENER, 1987). Os parasitos foram mantidos através de repiques semanais em camundongos BALB/c para os ensaios *in vivo* e em células Vero E6 cultivadas em meio RPMI acrescido de 5% de soro bovino fetal (SBF) para os ensaios *in vitro* com tripomastigotas e amastigotas.

4.3 Células

Para os ensaios de atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares e citotoxicidade foram utilizadas as células não fagocíticas profissionais da linhagem Vero E6 (Vero ATCC- CRL-1586).

As células Vero foram mantidas a 37°C em estufa umidificada de CO₂ em garrafas de cultura de 25 cm² em meio RPMI, pH 7,4+ 5% de SBF acrescido de 2 mM de L-glutamina, 10 µg/ml de estreptomicina e 10 UI/ml de penicilina, através de dois repiques semanais.

Para os bioensaios, as monocamadas celulares foram lavadas em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4 e tratadas com tripsina 0,25 % + EDTA 0,1% por 5 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em RPMI pH 7,4 + 5% de SFB, centrifugadas a 250 x g/5 minutos a 4°C e suspendidas no mesmo meio. A viabilidade celular foi verificada pelo corante vital Azul de tripano, a concentração ajustada para 10⁶ células/ml, semeadas em placas de 96 poços (2x10⁴ células/poço) em meio RPMI + 5% SFB e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram utilizadas para os bioensaios de citotoxicidade e atividade antiparasitária.

4.4 Animais

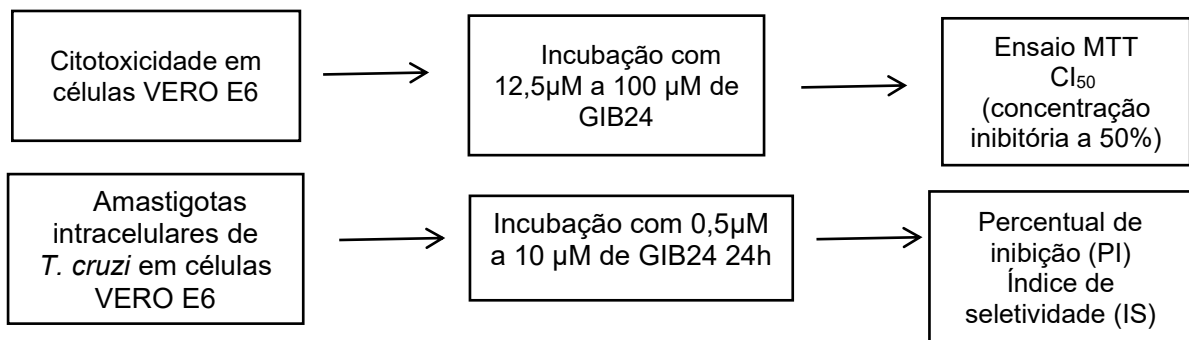
Os ensaios de atividade tripanocida *in vivo* foram realizados com camundongos BALB/c durante os ensaios *in vivo* I e toxidade *in vivo*, e BALB/c e Swiss, para os ensaios *in vivo* II e repetição do ensaio de toxidade *in vivo* em paralelo ao ensaio *in vivo* II, em ambos os experimentos os animais com 4 a 6 semanas, fornecidos pelo Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI) da UEPG ou pelo Laboratório de Criação e Experimentação Animal (LACEA) do Instituto Carlos

Chagas - Fiocruz/PR. Os animais foram mantidos nas instalações do NAEVI em condições padronizadas, em ambiente a $22\pm2^{\circ}\text{C}$, em um ciclo de luz e escuridão de 12:12h e tratados com ração e água “*ad libitum*”. O uso de animais para realização dos experimentos teve aprovação pelo Comitê de Ética em uso de Animais da UEPG (Processo CEUA: 0192976, 2020).

O delineamento experimental adotado neste estudo (Figura 09), segue as sugestões de padronização de protocolo para ensaios de atividade tripanocida *in vivo* proposto por ROMANHA *et al* (2010).

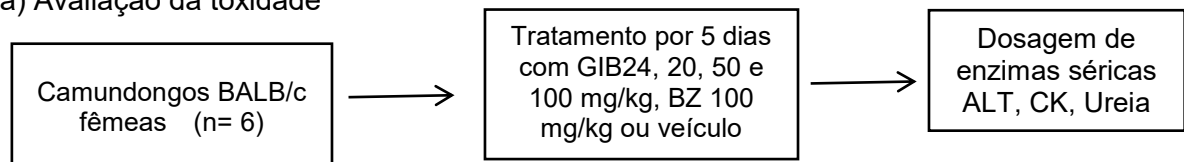
Figura 09 - Fluxograma do delineamento experimental proposto para o estudo

Avaliação *in vitro* - Definição do índice de seletividade de GIB24 contra amastigotas intracelulares em células VERO E6.

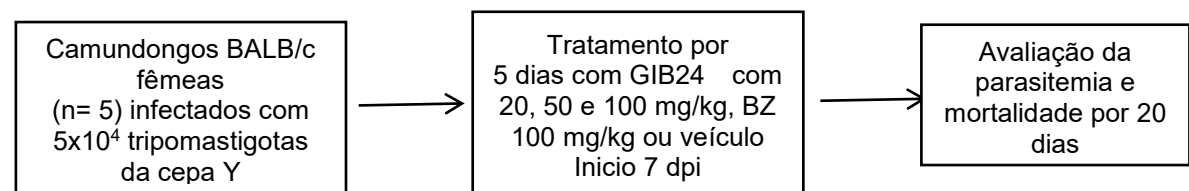


Avaliação *in vivo* I – Definição da dose ótima de GIB24.

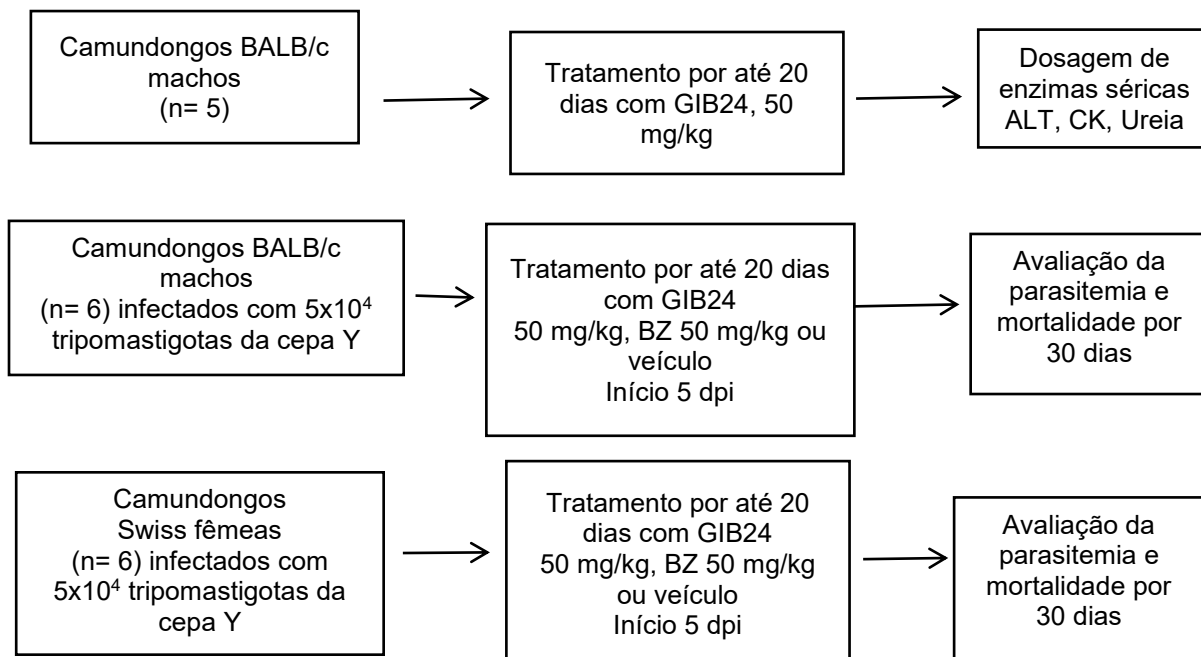
a) Avaliação da toxicidade



b) Avaliação do efeito tripanocida



Avaliação *in vivo* II – Avaliação da eficácia do composto testado na dose definida na etapa *in vivo* I em camundongos machos e fêmeas.



Fonte: Adaptado de: ROMANHA, A. J.; DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M.D.C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS, J.; ROMERO, L.H.; BAHIA, L.I.; TEREZINHA, M.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W. E.A. DE ARAÚJO, Z. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2 p. 233-238, 2010.

4.5 Análise *In Silico*

Diferentes análises no modelo *in silico* foram feitas com o composto GIB 24, a fim de realizar um levantamento quanto a suas características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e predição de propriedades ADME-Tox (absorção distribuição, metabolização e toxicidade). Nesse procedimento foram utilizados programas e servidores disponíveis na *web* que predizem os parâmetros físico-químicos da molécula como ligante e sua possível toxicidade.

A estrutura *Simplified Molecular Input Line (Smile)* de GIB24 foi disponibilizada na área de entrada (*input*) dos seguintes servidores: *SwissADME* "<http://www.swissadme.ch/>"; *pkaCSM- Predicting small-molecule pharmacokinetic properties* "<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>"; *ProTox II - Prediction Of Toxicity of Chemicals* "https://tox-new.charite.de/protox_II/"; *Labmol* "<http://www.labmol.com.br/>"

e *Chemicalize* "<http://www.chemicalize.org>" e obtidas as informações das propriedades de interesse sobre o composto.

Todos os servidores foram empregados utilizando os parâmetros na forma padronizada definidos pelo servidor (*default*).

4.6 Avaliação Da Atividade Antiparasitária In Vitro

4.6.1 Ensaios de citotoxicidade em células VERO E6

Células VERO E6 foram incubadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) a 37°C e 5% de CO₂ com diferentes concentrações (12,5 a 100 µM) de GIB24. A integridade do tapete celular foi observada em microscópio invertido Olympus, seguida do ensaio colorimétrico do MTT ([3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio], Amresco, Ohio), conforme descrito por Loosdrecht e colaboradores (1991) e modificado por Sieuwerts e colaboradores (1995). Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória a 50%) foram estimados a partir dos valores médios obtidos de três réplicas em dois experimentos independentes, por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat 3®. Em todos os ensaios foram utilizados o solubilizante DMSO 1% como controle.

4.6.2 Ensaios de atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares

Células Vero previamente semeadas em placas de 96 poços (10^4 células/poço) foram infectadas com tripomastigotas da cepa Y provenientes de cultivo celular, na proporção de dez parasitos por célula. Após quatro horas, as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não interiorizados e mantidas em 180 µl/poço de DMEM + SFB 10% a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações (0,5 µM a 25 µM) de GIB24 em um volume final de 200 µl/poço, nas mesmas condições por 48 horas. Como controles foram utilizados o BZ e o solubilizante DMSO a 1%. Para se certificar de que a diminuição do número de células infectadas não tenha ocorrido pela lise da célula hospedeira, decorrente do ciclo de multiplicação intracelular, as monocamadas foram observadas em microscópio invertido (Olympus bx41) para verificar a presença de tripomastigotas no sobrenadante. As placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa (Merck, Darmstadt). A avaliação da atividade

tripanocida foi realizada pela contagem aleatória de 200 células por poço em microscópio invertido (Olympus bx41), objetiva 40x, observando-se o número de células infectadas, o número de amastigotas intracelulares e o número de amastigotas/célula.

Os valores foram expressos como percentual de inibição (PI), o qual foi calculado segundo Guru e colaboradores (1989) e modificado por Lakshmi e colaboradores (2007), utilizando a seguinte fórmula: $PI = 100 - (T/C \times 100)$, onde T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas; C é a média do total de amastigotas intracelulares em células do controle DMSO 1%.

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50%) foram estimados a partir dos valores de PI obtidos em três réplicas em duplicata. A estimativa do Índice de Seletividade (IS), foi obtida através do valor da razão entre a CC_{50} (concentração citotóxica para 50%) e a CI_{50} (concentração inibitória para 50%).

4.7 Avaliação Da Toxicidade *In Vivo*

Para avaliação dos parâmetros de toxicidade, quatro grupos de seis camundongos fêmeas de BALB/c hígidos, pesando entre 25 a 30 g, foram tratados com GIB24, a 20, 50 e 100 mg/kg/dia ou apenas veículo (DMSO 5%), uma vez ao dia, por gavagem, durante 5 dias. A toxicidade foi avaliada através da observação de contrações logo após a administração do composto, alteração de peso e movimentação, perda e aspecto do pelo seguindo os protocolos de *screening* hipocrático determinado por Moura *et al.* (2020).

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 1,0 ml/kg de cloridrato de cetamina e 1,5 ml/kg de cloridrato de xilazina para a coleta de sangue por punção retrorbital e imediatamente após sacrificados por deslocamento cervical.

Após a coagulação, as amostras de sangue foram centrifugadas à 2.000 x g por 5 minutos, o soro transferido para novo microtubo e as amostras foram imediatamente enviadas para o Laboratório de Análises Clínicas de Ponta Grossa (LAPAC). Como marcadores séricos de toxicidade e injúria tecidual foram avaliadas alanina aminotransferase (ALT), creatinoquinase (CK) e ureia, como marcadores clássicos de dano no fígado, coração e rins, respectivamente.

4.8 Avaliação Da Atividade Antiparasitária *In Vivo*

4.8.1 Readaptação da cepa Y no modelo murino

Para a recuperação da virulência e do perfil de infecção da cepa Y no modelo murino, tripomastigotas provenientes da infecção *in vitro* de células Vero E6 foram, inicialmente, inoculados intraperitonealmente (i.p.) em três camundongos BALB/c (5×10^4 tripomastigotas/camundongo). A parasitemia foi verificada no 7º ou 8º dia pós-infecção (p.i), que representa o pico da parasitemia, através do exame a fresco de 5 µl de sangue coletados por punção caudal. Os camundongos positivos, foram anestesiados via i.p. com 1,0 ml/kg de cloridrato de cetamina e 1,5 ml/kg de cloridrato de xilazina e submetidos a punção retroorbital antes do óbito para coleta dos tripomastigotas sanguíneos que foram utilizados para infectar novo grupo de 3 a 5 animais. Após quatro passagens semanais sucessivas, a parasitemia foi acompanhada diariamente através do método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962) para confirmar a recuperação do perfil da curva de parasitemia clássica da cepa Y.

Após a readaptação e recuperação da cepa Y no modelo murino, os tripomastigotas sanguíneos foram utilizados para infectar os grupos experimentais para os respectivos ensaios de atividade antiparasitária *in vivo* I e *in vivo* II.

4.8.2 Avaliação da atividade antiparasitária *in vivo* I

O tratamento da fase aguda foi realizado utilizando cinco grupos de 5 camundongos BALB/c, fêmeas, com seis semanas de idade, pesando entre 25 a 30 g. Para tanto, os camundongos foram inoculados via i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* por animal.

Sete dias p.i., os animais foram tratados uma vez ao dia pela via oral (gavagem) durante 5 dias consecutivos com (1) GIB24 100 mg/kg/dia; (2) GIB24 50 mg/kg/dia; (3) GIB24 20 mg/kg/dia, (4) Benzonidazol 100 mg/kg/dia e (5) Veículo (DMSO 5%).

A partir do início do tratamento, a parasitemia dos animais foi avaliada diariamente através de exame a fresco pelo método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962) e a taxa de mortalidade foi acompanhada até 20 dias pós tratamento e expressa como percentagem cumulativa.

Ao final do experimento, os animais sobreviventes foram anestesiados via intraperitoneal com 1,0 ml/kg de cloridrato de cetamina e 1,5 ml/kg de cloridrato de xilazina e imediatamente eutanasiados por deslocamento cervical.

4.8.3 Avaliação da atividade tripanocida *in vivo* II

Em um segundo experimento três grupos de seis camundongos BALB/c machos com seis semanas de idade, pesando entre 25 a 30 g, foram inoculados via i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y por animal. Cinco dias após a infecção, a partir da dose definida no modelo *in vivo* I, os animais foram tratados uma vez ao dia pela via oral (gavagem) durante 20 dias consecutivos com (1) (GIB24 50 mg/kg/dia); (2) (benzonidazol 50 mg/kg/dia) e (3) (veículo - tween 80 - 3%). De maneira semelhante, dois grupos de seis camundongos Swiss fêmeas com seis semanas de idade, pesando entre 25 a 30 g, foram inoculados via i.p. com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y por animal. Cinco dias após a infecção, a partir da dose definida no modelo *in vivo* I, os animais foram tratados uma vez ao dia pela via oral (gavagem) durante 20 dias consecutivos com GIB24 50mg/kg e (veículo - tween 80- 3%). A atividade tripanocida em ambos os grupos foi avaliada através da análise da parasitemia em exame a fresco, realizado em 7, 11, 9, 13 e 15 dias pós infecção (dpi), bem como da taxa de mortalidade acompanhada até 30 dias após o tratamento, conforme descrito por ROMANHA *et al.* (2010). Os animais sobreviventes foram anestesiados via intramuscular com 1,0 ml/kg de cloridrato de cetamina e 1,5 ml/kg de cloridrato de xilasina e em sequência eutanasiados por deslocamento cervical.

Para confirmação da reprodutibilidade dos resultados obtidos anteriormente na avaliação dos parâmetros de toxicidade, um novo grupo de cinco camundongos machos Swiss pesando entre 25 a 30 g, foram tratados diariamente com GIB24, 50 mg/kg/dia durante até 20 dias. Como controle, foi utilizado um grupo de quatro animais, sem tratamento e mantidos no biotério nas mesmas condições e pelo mesmo período do experimento de toxicidade (Grupo Naive). Ao final do experimento, as enzimas séricas foram novamente avaliadas conforme descrito no item 4.7.

4.9 Exame Parasitológico a Fresco

A parasitemia foi avaliada através de exame a fresco de 5µl de sangue obtido da cauda dos animais através do método de Pizzi-Brener (BRENER, 1962), o qual consiste na contagem microscópica dos tripomastigotas em 50 campos por lamínula (22 x 22 mm) em cinco mm³ de sangue.

4.10 Análise Estatística

Nos ensaios *in vitro* as análises estatísticas dos parâmetros avaliados entre o grupo controle e os grupos tratados foram feitas pelo método de Análise de Variância Simples (One Way ANOVA). Nos ensaios *in vivo*, as análises estatísticas dos parâmetros avaliados entre o grupo controle e os grupos tratados foram feitas pelo método de Análise de Variância (One Way e Two Way ANOVA), com pós teste de Tukey. Para a verificação de diferenças estatísticas dos parâmetros avaliados em ambos os ensaios foi adotado como critério de significância no nível de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média e avaliados com auxílio do programa GraphPad Prism® 5.01.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação *In Silico*

Para a avaliação farmacocinética *in silico* das propriedades de GIB24, utilizou-se os servidores *SwissADME* e *pKaCSM*, concomitantemente, considerando que uma molécula com potencial para ser usada como medicamento oral geralmente segue as 5 regras de Lipinski (Ro5) (LIPINSKI *et al.*, 2001). No presente estudo GIB24 atendeu às regras sem violações na avaliação para os critérios em ambos os *softwares*, exibindo a probabilidade de ser um bom candidato a fármaco oral (Tabela 01).

Tabela 01 - Análise *in silico* das propriedades químicas de GIB24

Composto	miLogP	TPSA (Å²)	Peso molecular (Da)	Volume (Å³)	nON	nOHNH
GIB24	logP= 2,4	38,05	196,34	224,85	2	2

miLogP= coeficiente de partição (n-octanol/água); TPSA= área de superfície polar topológica; nON= número de aceitadores de ligação de hidrogênio; nOHNH= número de doadores de ligação de hidrogênio.

A avaliação de GIB24 evidenciou um composto de natureza predominantemente hidrofóbica e, portanto, com baixo teor de solubilidade em água com log P = 2,4 e Log S= -2,57; considerando-se um composto hidrofílico log P ≤ 1 e um composto hidrofóbico log P ≥ 1. Na avaliação realizada com o *software Chemicalize* foram obtidos valores de log P em pH 7,4 (sanguíneo) de -0,31, e valor relativo ao pKa = 9,66, sendo GIB24 classificado como base relativamente forte para fármacos, com alta ionização para valores de pH biológicos.

As análises também indicam que GIB24 possui alta permeabilidade intestinal (92%), com índices proeminentes de permeabilidade celular no modelo de referência Caco-2 e baixa promiscuidade para as principais isoformas da superfamília das enzimas de citocromo CYP (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), importantes no metabolismo de fármacos e xenobióticos.

GIB24 demonstrou possuir baixa permeabilidade na pele (log Kp= -2,872 (permeabilidade ótima Log Kp ≤ -2,5 (servidor *pKaCSM*)) e baixa permeabilidade na

barreira hematoencefálica (BHE 0,069, valor de referência para permeabilidade ótima ≤ 1 (servidor *pKaCSM*)).

Com relação à toxicidade aguda em ratos, o valor para dose mais alta na qual nenhum efeito adverso é observado (LOAEL) foi de 2,4mg/kg/dia). A análise em ambos os servidores (*SwissADME* e *pKaCSM*) sugere que a molécula não possui potencial carcinogênico ou mutagênico.

Visando complementar os resultados do risco de toxicidade, foram avaliados outros parâmetros específicos, como a dose letal de 50% dos indivíduos (DL_{50}) e o nível toxicológico. Para isto, GIB 24 foi analisada com auxílio do *software ProTox-II*, o qual utiliza a classificação de toxicidade do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação de Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (BANERJEE *et al.*, 2018), que estabelece os seguintes critérios de classificação: Classe I: Letal ($DL_{50} \leq 5$); Classe II: Letal ($5 < DL_{50} \leq 50$); Classe III: Tóxico ($50 < DL_{50} \leq 300$); Classe IV: Nocivo ($300 < DL_{50} \leq 2000$); Classe V: Pode ser nocivo ($2000 < DL_{50} \leq 5000$); Classe VI: Não tóxico ($DL > 5000$). O software indicou para GIB24 uma DL_{50} de 700 mg/Kg, enquadrada na classe IV de classificação (não letal, mas potencialmente nocivo) (BANERJEE *et al.*, 2018).

A análise de toxicidade ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) também indicou ausência de fragmentos estruturais de risco na molécula GIB24, resultando em uma baixa probabilidade do composto vir a apresentar efeitos prejudiciais nos parâmetros avaliados. Em vista da ausência de potenciais efeitos mutagênicos, tumorigênicos e fatores irritantes ou que venham a interferir na reprodução, esses dados corroboram com a análise descrita acima com base nos *softwares SwissADME* e *pKaCSM*.

Os resultados obtidos com auxílio da plataforma *SwissADME* também alertaram para presença de terminações do tipo alcanos e terpenos e ainda presença de dupla ligação isolada na estrutura química de GIB24, consequentemente indicando uma possível relação com toxicidade hematológica (DIANA *et al.*, 2017)

Para previsão da toxicidade cardíaca de GIB24 foi utilizado o *software Labmol* que resultou em probabilidade de toxicidade fraca ou moderada (valor 0,14 com limite aceitável de valor basal 0,26) revelando que a molécula não é potencial bloqueadora hERG. O bloqueio dos canais hERG K^+ está intimamente associado com arritmia cardíaca letal.

5.2 Atividade Tripanocida Frente a Formas Amastigotas Intracelulares

Inicialmente a citotoxicidade e a atividade tripanocida do novo lote de GIB24 foi novamente avaliada contra formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células Vero E6. Nossos resultados mostram que a diaminoetano GIB24 não foi citotóxica para células da linhagem VERO E6 ($CC_{50} = 296,4 \mu M$) e foi ativa contra a cepa Y, com taxas de inibição variáveis para cada concentração testada, cujos resultados foram reprodutíveis nos dois lotes e em todas as repetições (Tabela 02).

Os resultados mostram que houve diminuição significativa no número de células infectadas e de amastigotas intracelulares nas células tratadas com GIB24 em todas as concentrações testadas em relação ao controle ($p < 0,05$) (Tabela 02; Figura 10). O percentual de inibição foi de 100% nas duas maiores concentrações e de 88,52% e 58,97% nas concentrações de 3 e 0,5 μM , respectivamente (Tabela 02).

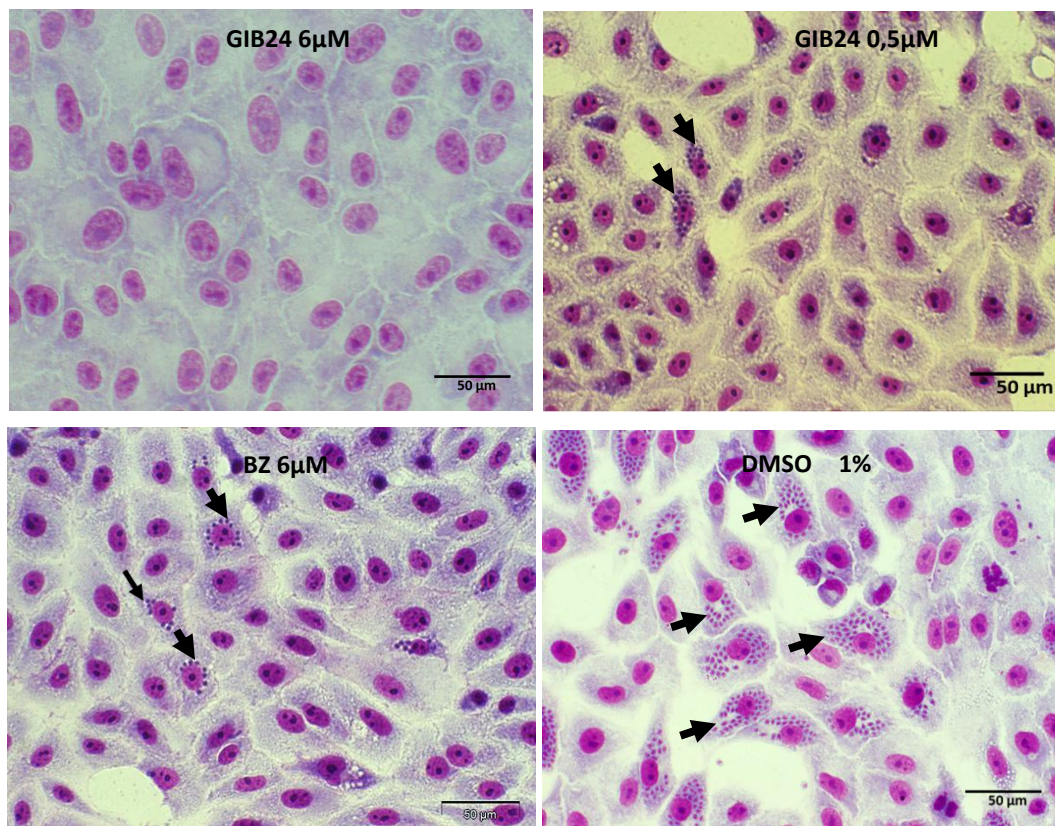
A Tabela 02 mostra a atividade tripanocida de GIB24 contra formas amastigotas da cepa Y em células Vero pelo GIB24 ($CI_{50} < 0,5 \mu M$), que foi pelo menos 20 vezes maior que a observada para o fármaco de referência BZ ($CI_{50} = 11,36 \mu M$). Nossos resultados mostram que GIB24 apresentou um índice de seletividade ($IS > 180$) contra amastigotas intracelulares em células Vero, sendo maior em comparação com BZ ($IS > 44$).

Tabela 02 - Efeito de GIB24 e benzonidazol (BZ), após 48h de incubação, expresso como percentual de inibição e CI_{50} sobre formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (cepa Y) e Índice de Seletividade (IS) em relação à células Vero E6

	Percentual de inibição					$CI_{50} (\mu M)$		$CC_{50} (\mu M)$	
	0,5 μM	3 μM	6 μM	12 μM	25 μM	<i>T. cruzi</i>	Vero E6	*IS	Vero E6
GIB24	58,9±7,6	88,5±4	100	100	100	< 0,5	180,3±27	>180	296,4
BZ	0	6,8±2,1	38,7±1,5	62,3±4,3	100	11,3±1,8	> 500	>44	-

*Índice de Seletividade = citotoxicidade/efeito tripanocida.

Figura 10 - Atividade tripanocida de GIB24 sobre formas amastigotas em células Vero E6



Fonte: Os autores. BZ= benzonidazol. As setas indicam os amastigotas intracelulares.

Aumento: 200x.

A expressiva atividade do composto GIB24 *in vitro* contra as formas amastigotas intracelulares, assim como os relatos da atividade de compostos derivados de diaminas em outros estudos que utilizam o modelo *in vivo* nos estimularam a testar, pela primeira vez, a atividade tripanocida *in vivo* de GIB24 no modelo experimental agudo da doença de Chagas.

5.3 Avaliação Da Toxicidade *In Vivo*

Em relação ao estado geral dos camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, foram observados sinais de apatia e eriçamento do pêlo nos três grupos que receberam GIB24. Em nenhum momento, os animais manifestaram episódios de contrações involuntárias, tremores, convulsões e nem alteração de peso (Figura 11), comparado ao grupo controle (veículo – DMSO 5%).

A avaliação bioquímica mostrou alterações nos marcadores séricos de toxicidade analisados (Tabela 03), em todos os grupos, inclusive no controle (DMSO

5%), não sendo possível estabelecer uma correlação entre toxicidade e GIB24. Dessa forma, não foi possível concluir se a alteração nos parâmetros bioquímicos foi decorrente de problemas de base dos animais ou da toxicidade de GIB 24 ou até mesmo do próprio solubilizante (DMSO 5%).

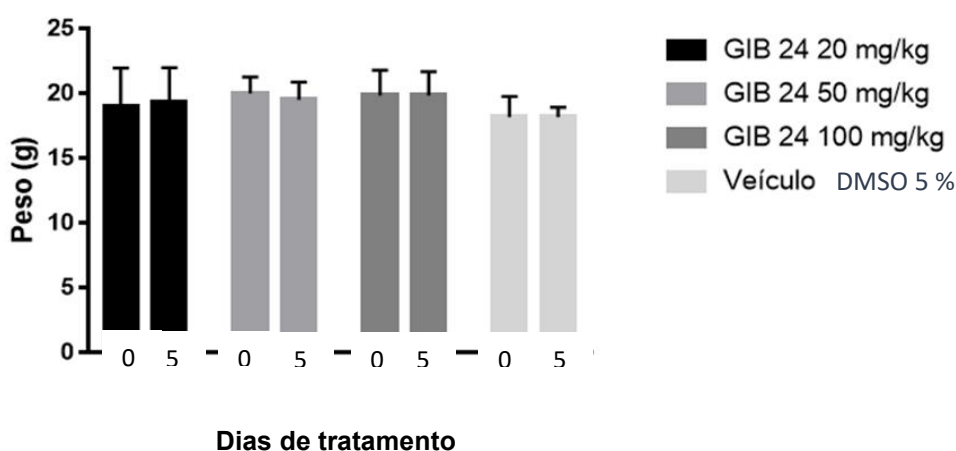
Tabela 03 – Avaliação de parâmetros séricos em camundongos BALB/c fêmeas e tratados com GIB24.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de seis camundongos tratados com GIB24 em DMSO 5% em três doses e veículo por um período de 5 dias. ALT = Alanina aminotransferase; CK= Creatinoquinase.

Grupos	ALT (U/L)	CK (U/L)	Ureia (mg/dL)
GIB24 100 mg/kg	210 $\pm$ 17,08	1.940 $\pm$ 1.089,85	45,6 $\pm$ 2,81
GIB24 50 mg/kg	184,3 $\pm$ 90,7	3.542,6 $\pm$ 1.431,82	46 $\pm$ 6,1
GIB24 20 mg/kg	105 $\pm$ 9,54	2.160,6 $\pm$ 73,24	48,3 $\pm$ 7,09
Veículo (DMSO 5%)	162 $\pm$ 127,6	3.080 $\pm$ 1.709,78	75 $\pm$ 0
⁺ Valores de referência BZ	40 $\pm$ 77,6	296 $\pm$ 122	56 $\pm$ 9
[#] Valores de referência	29,72 $\pm$ 4,40	502 $\pm$ 507	41,48 $\pm$ 9

⁺da SILVA *et al.*, 2012; [#]BARBOSA *et al.*, 2017; SALOMÃO *et al.*, 2010.

Figura 11- Avaliação da variação de peso antes e após cinco dias de administração oral de GIB24. O gráfico expressa os valores da média e desvio padrão de seis camundongos BALB/c fêmeas tratados com GIB24 em três doses, em comparação ao grupo não tratado (DMSO 5%) por um período de 5 dias.

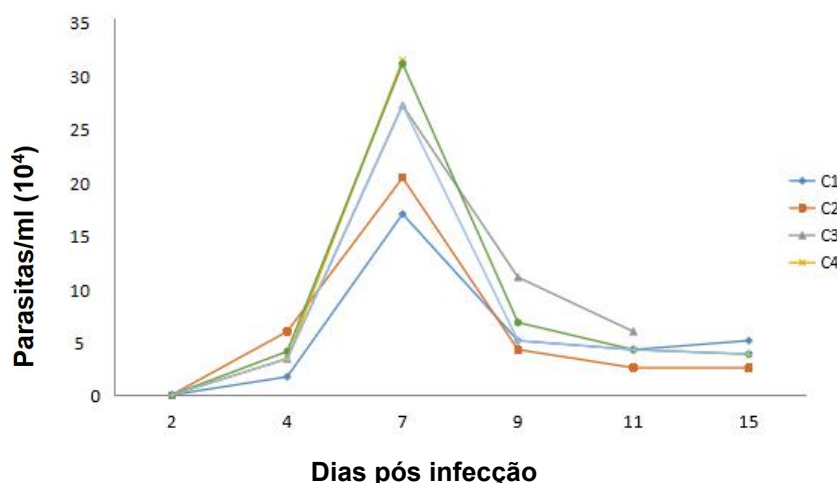


5.4 Avaliação Da Atividade Antiparasitária *In Vivo*

5.4.1 Readaptação da cepa Y de *T. cruzi* ao modelo *in vivo*

Após 4 passagens semanais da cepa Y realizadas semanalmente, em grupos de 3 a 5 camundongos BALB/c foi observado o perfil da parasitemia já descrito para esta cepa (BRENER; CHIARI, 1962). A figura 12 mostra o curso da infecção da cepa Y readaptada a camundongos BALB/c, com pico de parasitemia no 7º dia pós infecção, atingindo entre 2 a 3 x 10⁵ tripomastigotas/ml. Após esse período de readaptação da cepa foi possível realizar os ensaios *in vivo*.

Figura 12 - Curso da infecção da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após quatro passagens em camundongos BALB/c, acompanhado por 15 dias pós infecção. Os dados representam a parasitemia de quatro camundongos (C1 a C4).

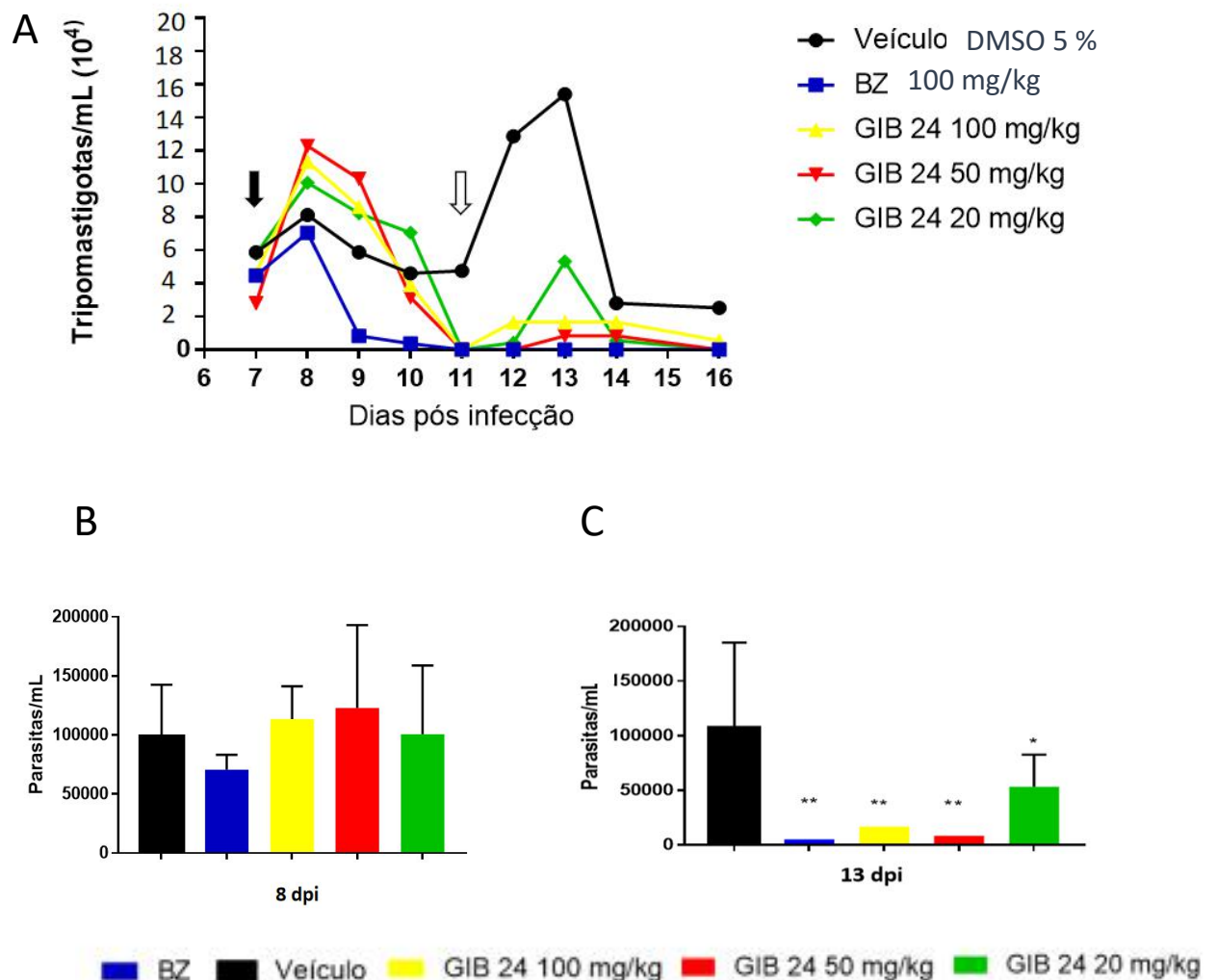


5.4.2 Atividade tripanocida *in vivo* I

O principal objetivo desta etapa foi selecionar a dose mais efetiva de GIB24 em reduzir a parasitemia de camundongos fêmeas experimentalmente infectados pela cepa Y de *T. cruzi* na fase aguda, utilizando três doses diferentes de GIB24, via oral durante 5 dias consecutivos.

O tratamento com GIB24 em três doses diferentes (20, 50 e 100 mg/kg/dia), iniciado no sétimo dia pós-infecção (p.i), alterou o curso da infecção natural da cepa Y, causando uma redução nas taxas de parasitemia, sobretudo após o 11º dia p.i. (Figura 14 A).

Figura 13 - Avaliação inicial do efeito tripanocida *in vivo* de GIB24 e definição da melhor dose. (A) Camundongos BALB/c fêmeas infectadas com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram tratados com três doses de GIB24 e benzonidazol (BZ) 100 mg/kg/dia. As setas preta e branca correspondem ao início e fim do tratamento, respectivamente. Os valores obtidos no 8° e 13° dias, que correspondem aos picos de parasitemia, foram destacados em (B) e (C), respectivamente. Os resultados são apresentados como as médias de 5 animais por grupo, ao longo de 16 dias pós-infecção. (*) indica diferença significativa ($p<0,05$), (**) indica diferença significativa ($p<0,01$) comparado com o veículo.



Em relação aos grupos tratados com GIB24, foi observada uma diminuição na parasitemia ao longo do período patente da infecção em comparação com o grupo não tratado (veículo - DMSO 5%). O grupo tratado com GIB24 apresentou diminuição estatisticamente significativa a partir do 11º dia pós infecção ($p<0,05$), com

parasitemia semelhante à dos animais tratados com BZ, a qual se manteve menor que a do veículo até o dia 16º dpi.

Os grupos infectados e tratados com GIB24 apresentaram diferenças em relação ao veículo quanto ao dia de pico máximo de parasitemia. Embora o pico primário e a parasitemia recrudescente sejam evidentes nos grupos tratados com GIB24, no 8º dia após a infecção, houve diminuição significativa da parasitemia no 13º dia pós infecção para os grupos tratados com GIB24 em comparação com o veículo ($p<0,05$).

Em uma comparação entre as doses utilizadas, a administração de GIB24 a 50 e 100 mg/kg foi capaz de controlar o curso da infecção ao longo de um período de 16 dias pós-infecção, diferente da dose de 20 mg/kg, cujos animais apresentaram um aumento da parasitemia no 13º dia pós-infecção ($p<0,05$) (Figura 13 B-C). Esses resultados sugerem que a menor dose efetiva de GIB24 é de 50 mg/kg/dia, a qual foi capaz de controlar o curso da infecção e reduziu significativamente a parasitemia em comparação ao veículo ($p<0,05$), com a metade da dose de BZ recomendada para os ensaios experimentais *in vivo*.

5.4.3 Atividade tripanocida e toxicidade *in vivo* II

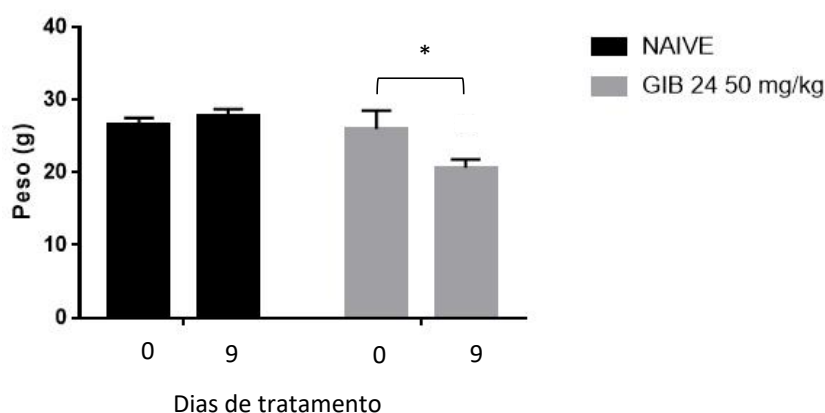
Com base nos resultados da fase *in vivo* I, que mostrou um efeito em potencial de GIB24 na dose de 50 mg/kg/dia, o objetivo desta etapa foi confirmar os resultados e avaliar o efeito tripanocida em tratamento prolongado por 20 dias, tanto em camundongos machos quanto fêmeas. Diante dos resultados inconclusivos nos ensaios de toxicidade (Tabela 02), o solubilizante do BZ foi substituído por Tween 80 a 3% e do GIB24 por água destilada estéril. Além disso, a toxicidade foi novamente avaliada em animais não infectados e somente com a dose de 50 mg/kg/dia de GIB24, utilizando como controle um grupo Naive (sadios e sem tratamento), conforme descrito em 4.8.3. Os ensaios antiparasitários foram realizados com camundongos BALB/c (machos) e Swiss (fêmeas) e a toxicidade com Swiss (machos), de acordo com a disponibilidade de animais no LACEA/Fiocruz e complementação dos ensaios *in vivo* I, em relação a representatividade de ambos os sexos.

No ensaio de toxicidade com GIB24 (50 mg/Kg/dia) os camundongos Swiss machos não apresentaram convulsões, contorções nem tremores. Mas foram

observadas algumas alterações no estado geral como apatia, eriçamento do pêlos, perda de mobilidade ou movimentação dentro da caixa de contenção de acordo com o *screening* hipocrático (MOURA *et al.*, 2020). Durante a realização do tratamento, dois dos cinco camundongos do grupo tratado com GIB24 morreram entre o 8º e 9º dia e os demais foram pesados e sacrificados devido a debilidade do estado geral, sugerindo a toxicidade de GIB24 em tratamentos acima de 5 dias.

Diferentemente do que foi observado com as fêmeas (Figura 11), os três machos sobreviventes até o 9º dia de tratamento com GIB24 apresentaram redução significativa no peso ($p < 0,05$) (Figura 14). Contrariamente, os animais do grupo Naive se mantiveram em bom estado geral ao longo de todo o experimento e sem alteração de peso.

Figura 14 - Avaliação da variação de peso antes e após nove dias de administração oral de GIB24 em camundongos não infectados. O gráfico expressa os valores da média e desvio padrão de três camundongos tratados com GIB24 50 mg/kg por um período de 9 dias e quatro não tratados (Naive). (*) indica diferença estatística de ($p < 0,05$) entre 0 e 9 dias de tratamento.



A análise bioquímica mostrou um aumento significativo nos parâmetros de ALT ($p < 0,05$) (Tabela 04) nos animais tratados com GIB24 50 mg/kg em comparação com o grupo Naive após 9 dias de tratamento. Porém, novamente foram observados valores muito alterados em relação aos valores estabelecidos como referência nos marcadores séricos de toxicidade tanto para o grupo tratado quanto para os animais Naive (Tabela 04).

Tabela 04 – Avaliação de parâmetros séricos em camundongos Swiss machos não infectados e tratados com GIB24. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de quatro a cinco camundongos tratados com GIB24 50 mg/kg e Naive (sadio, não manipulado). ALT = Alanina aminotransferase; CK= Creatinoquinase. (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre GIB 50 mg/kg e Naive

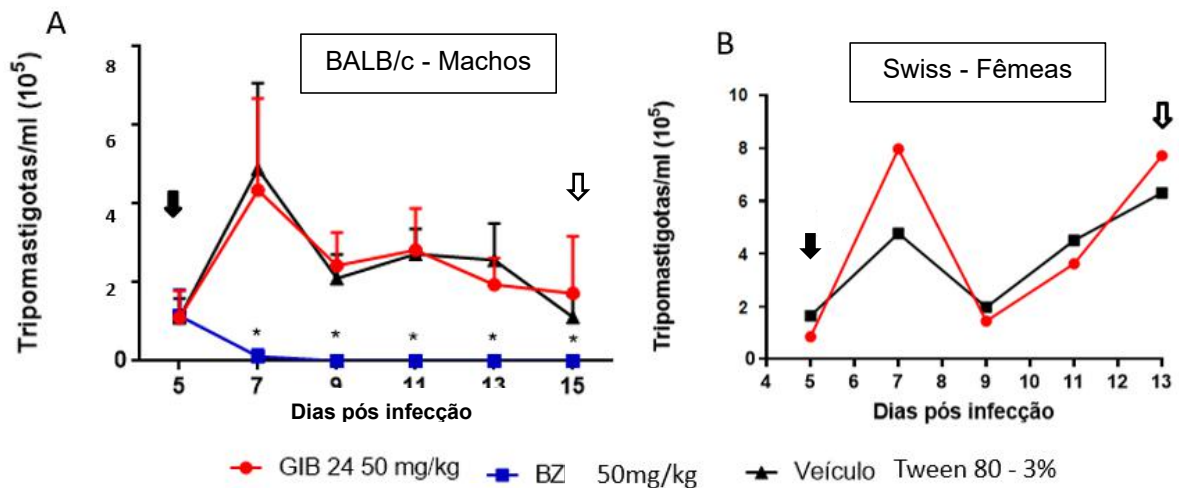
Grupos	ALT (U/L)	CK(U/L)	Ureia (m/dL)
Naive	121,25 $\pm$ 29,98	1108 $\pm$ 243,33	80,25 $\pm$ 4,5
GIB24 50 mg/kg	220 $\pm$ 77,78*	851,5 $\pm$ 143,54	76 $\pm$ 1,41
#Valores de referência Naive	22 $\pm$ 5	502 $\pm$ 507	52 $\pm$ 12

#BATISTA *et al.*, 2010; SALOMÃO *et al.*, 2010.

O tratamento com GIB24 50 mg/kg com início no 5º dpi não foi capaz de modificar o curso da infecção natural da cepa Y, nem reduzir a parasitemia em relação ao grupo controle, tanto em camundongos BALB/c machos quanto em Swiss fêmeas (Figura 15A, B). Além disso, nenhum dos dois grupos avaliados completaram o esquema de tratamento previsto para um período de até 20 dias, tendo duração de 11 dias para camundongos machos e 9 dias para camundongos fêmeas devido a mortalidade (Figura 16). Contrariamente, o grupo BZ 50 mg/kg/dia apresentou redução significativa da parasitemia ($p < 0,05$) e menor período patente em comparação com GIB24 ($p < 0,05$) (Figura 16 A).

Assim como observado com camundongos machos, a curva de parasitemia de camundongos fêmeas mostrou que não houve diferenças significativas entre os animais tratados com GIB24 50 mg/kg e o grupo tratado com veículo (Tween 80 3%) (Figura 15 B).

Figura 15 - Avaliação do efeito tripanocida *in vivo* de GIB24 em camundongos machos e fêmeas. Camundongos BALB/c machos e Swiss fêmeas infectados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram tratados com GIB24 50 mg/kg/dia, benzonidazol (BZ) 50 mg/kg/dia ou veículo. Os valores expressam a média da parasitemia acompanhada até o 15º dia pós-infecção para camundongos machos (Figura A) e 13º dia para camundongos fêmeas (Figura B). As setas preta e branca correspondem ao início e fim do tratamento, respectivamente. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de 3 a 6 animais. Os (*) indicam diferença estatística entre os grupos tratados com BZ em comparação com veículo e GIB24 50 mg/kg.

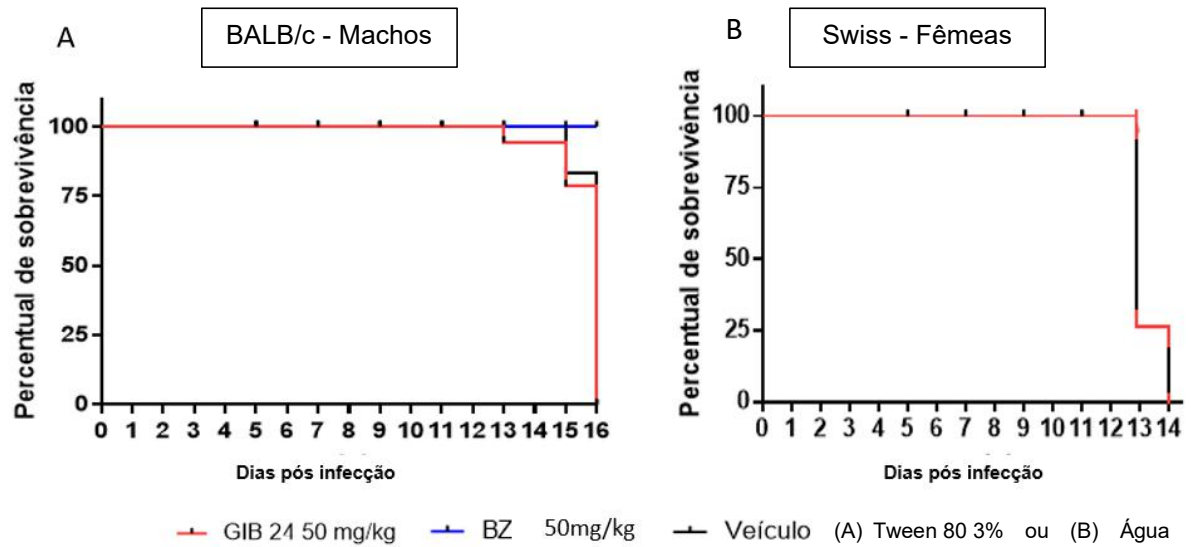


5.3.4 Sobrevivência dos camundongos infectados no ensaio *in vivo* II

O tratamento diário dos camundongos machos e fêmeas utilizando-se uma dose de 50 mg/kg/dia não alterou o curso da infecção e não protegeu da mortalidade frente a infecção experimental pela cepa Y (Figura 16 A, B).

Todos os camundongos machos tratados com GIB24 e veículo morreram entre o 13º e 16º dia após a infecção, sem completar o esquema de tratamento previsto para 20 dias (Figura 16 A). De maneira semelhante o tratamento de camundongos Swiss fêmeas com GIB24 a uma dose de 50 mg/kg, não foi capaz de proteger os animais contra a mortalidade (Figura 16 A). Todos os animais do grupo GIB24 e veículo morreram entre o 13º e 14º dia após a infecção. Contrariamente, o tratamento com BZ 50 mg/kg/dia protegeu 100% dos camundongos machos em relação a mortalidade ao longo do período avaliado (Figura 16 A).

Figura 16 - Avaliação da sobrevivência de camundongos BALB/c (machos) e Swiss (fêmeas) infectados e tratados. Os camundongos foram experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral por até 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção com GIB24 50mg/kg/dia, as retas no gráfico representam o percentual de sobrevivência dos animais ao longo de um período de 16 dpi para camundongos machos (Figura A) e 14 dpi para camundongos fêmeas (Figura B).



6 DISCUSSÃO

Apesar das iniciativas regionais na América Latina de controle do inseto vetor e da transmissão em bancos de sangue ter alcançado redução substancial do número de novos casos agudos (PINTO DIAS, 2009), outras preocupações ainda permanecem desafiadoras, como o potencial de reemergência da doença e a existência de vias alternativas de transmissão, tais como a materno-fetal e transmissão oral através de alimentos contaminados, que vem ocorrendo, mesmo em áreas antes consideradas não endêmicas (GASCON *et al.*, 2010; WHO, 2015).

Conforme revelado no estudo BENEFIT (Avaliação de benzonidazol para interromper a tripanossomíase), apesar da diminuição da carga parasitária promovida pelo tratamento com BZ, não há proteção contra a progressão das alterações de lesões cardíacas (TORRICO, 2013; MORILLO *et al.*, 2015; MOLINA *et al.*, 2016). O uso de terapia combinada do fármaco BZ e novos promissores candidatos anti-*T. cruzi* também exigem vigilância, já que a associação também não demonstra efeito preventivo. Os ensaios clínicos usando fexinidazol, outro composto nitroheterocíclico, muito ativo em ensaios pré-clínicos, foi interrompido devido ao perfil tóxico grave em pacientes e, portanto, descartado como novo candidato para terapia (COURA, 2009; DINIZ *et al.*, 2013; MOLINA *et al.*, 2016).

No entanto, avanços significativos obtidos nos aspectos biológicos e genéticos do parasita, além do sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, contribuíram com a identificação de diversos alvos biológicos para a pesquisa de novos fármacos. A maior parte destes alvos são enzimas essenciais para o parasita, como por exemplo, as fosfatases, a esterol-14-desmetilase, a cruzipaina e triponationa redutase, entre outras (DUSCHAK, 2016; BRANQUINHA *et al.*, 2015; VÁZQUEZ *et al.*, 2017).

A diversidade química dos inibidores enzimáticos, capazes de interagir com sistemas biológicos complexos em *T. cruzi*, representa o espaço químico biológico importante no estudo de alvos terapêuticos, valorizando o papel dos produtos naturais e da síntese orgânica como fontes valiosas de novas moléculas anti-*T. cruzi* (DAINA *et al.*, 2016).

Ao longo da última década, alguns grupos de pesquisa têm investigado moléculas com potencial atividade sob a via enzimática das poliaminas e demonstrado suas propriedades anti-*T. cruzi*, como por exemplo as diaminas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2012; YAMANAKA *et al.*, 2013; SALES JÚNIOR *et al.*,

2014; LEGARDA-CEBALLOS, 2015; OLMO *et al.*, 2016; ESCOLANO *et al.*, 2019). Triagens preliminares *in vitro* de compostos tripanocidas realizadas pelo nosso grupo, apontaram o potencial biológico da etanodiamina (GIB24), cujo índice de seletividade justificou a continuidade de estudos para o modelo *in vivo*. Sendo assim, como primeira etapa, a atividade biológica *in vitro* do novo lote de GIB24 foi confirmada, avaliando-se a citotoxicidade em células Vero E6 e a atividade antiparasitária *in vitro* contra formas amastigotas da cepa Y do parasito.

Assim, foi verificado que GIB24 gerou baixa citotoxicidade para células Vero com uma atividade tripanocida contra formas amastigotas da cepa Y em células Vero pelo menos 20 vezes maior que o BZ, GIB24 [$CI_{50} < 0,5 \mu M$], BZ ($CI_{50} = 11,36 \mu M$). Além disso, GIB24 foi capaz de eliminar 100% dos amastigotas intracelulares até a concentração de $5 \mu M$, enquanto o BZ sustentou esse efeito somente até $25 \mu M$.

Nossos resultados corroboram com outros trabalhos que avaliam a atividade antiparasitária de diaminas no modelo *in vitro*. Sales Junior e colaboradores (2014), verificaram que diaminas lipofílicas possuem atividade superior ao BZ contra amastigotas da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, cujos valores de CI_{50} variaram de $2,46-18,31 \mu M$. Del Olmo *et al.* (2016) avaliando cinco esperminas obtiveram melhores índices de seletividade ($IS = 108$) em comparação ao BZ tanto para formas tripomastigotas quanto para amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células Vero. Após o tratamento, as tetraminas 2, 3 e 5 nas concentrações de 10, 25 e $50 \mu M$, respectivamente, reduziram significativamente o número de amastigotas por célula em 81, 59 e 56%, respectivamente, enquanto BZ apresentou redução de apenas 39% em uma concentração de $10 \mu M$.

Del Olmo e colaboradores (2016) também investigaram o possível mecanismo de ação da tetraamina através de ensaios de inibição da enzima recombinante tripanotiona redutase (TR) de *T. cruzi*, que exerce importante papel antioxidante. As tetraaminas 2 e 3 com maior atividade antiparasitária inibiram seletivamente a TR de *T. cruzi*. Os autores também mostraram que a tetraamina 3 inibiu seletivamente, além da TR, a enzima superóxido dismutase de ferro nativa do parasita.

A proteção contra o estresse oxidativo em tripanosomatídeos é majoritariamente realizada pelas reações de oxirredução da TR, a qual está localizada principalmente no citoplasma e na mitocôndria do parasito. Por ser um alvo validado para o desenho racional de moléculas ativas contra tripanosomatídeos,

diversos inibidores reversíveis e irreversíveis da TR já foram descritos (MEZIANE-CHERIF *et al.*, 1994).

Outros estudos também reforçam a correlação entre a inibição de mecanismos de defesa ao estresse oxidativo do parasita e a atividade antiparasitária contra *T. cruzi* das diaminas. Yamanaka *et al.* (2013) ao avaliarem a atividade tripanocida de 17 diaminas lipofílicas *in vitro* contra a cepa Y de *T. cruzi*, obtiveram resultados promissores. Neste estudo 10 diaminas foram ativas contra epimastigotas de *T. cruzi*, com destaque para a diamina N-decil-1,6-hexanodiamina, a qual apresentou $CI_{50} = 1,6 \mu M$ e $IS > 187$ e foi mais de seis vezes mais potente do que benzonidazol contra formas epimastigotas. Neste estudo as diaminas também foram capazes de inibir a TR recombinante de *T. cruzi* sendo o composto derivado de diaminas cloridratadas DP25Cl, com maior efeito inibitório, 74,5% na concentração de $100 \mu M$.

Nossos resultados mostraram que o tratamento administrado por via oral por 5 dias consecutivos, com início a partir do 7º dpi com dose de 50 mg/kg/dia gerou os melhores efeitos na redução da parasitemia, sendo capaz de controlar a infecção pela cepa Y ao longo de um período de 16 dias após a infecção. Diante destes resultados, a dose de 50 mg/kg/dia foi selecionada para o prosseguimento dos ensaios denominados de “teste longo” ou clássico (BRENER, 1962, modificado por ROMANHA *et al.*, 2010) denominado *in vivo* II, que avalia a atividade terapêutica de GIB24 em modelo murino.

Nossos resultados são parcialmente concordantes com outros obtidos com derivados de diaminas em teste no modelo *in vivo*, os quais utilizam esquemas terapêuticos semelhantes ao utilizado em nosso estudo. Escolano *et al.* (2019) ao avaliarem o efeito antiproliferativo da cepa Tulahuen de *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, mostraram que a administração de 20 mg/kg de etano-1,2-diamina durante 5 dias consecutivos a partir do 10º dpi (início do período patente para essa cepa), causou uma redução na parasitemia em camundongos tratados com o composto em relação aos não tratados, tendo uma redução de 72% sobre o pico de parasitemia. Ao avaliarem a toxicidade do composto, todos os parâmetros bioquímicos testados para o tratamento em solução com a etano-1,2-diamina não foram significativamente alterados em relação aos parâmetros estabelecidos, contrariamente aos nossos resultados. No estudo de Olmo *et al.* (2016) o tratamento com tetraaminas denominadas 2 e 3 a 5 mg/kg/dia por um período de 5 dias, causaram

uma redução no pico de parasitemia de 40% e 59%, respectivamente, para a cepa SN3 em camundongos BALB/c, assim como reduziram a reativação da parasitemia após imunossupressão e taxas curativas de 33 e 50%, respectivamente.

Tendo em vista que o composto foi avaliado anteriormente em camundongos fêmeas e diante de relatos iniciais sobre a interferência do gênero no curso da infecção pelo *T. cruzi* e suscetibilidade aos tratamentos experimentais (GUEDES; DA SILVA, 2015) além da avaliação em camundongos fêmeas no modelo *in vivo* II avaliamos os efeitos da administração oral de GIB24 sobre camundongos BALB/c machos. O uso de modelo com utilização de camundongos machos se deve ao fato da sua menor suscetibilidade aos agentes tripanocidas e, portanto, são altamente preferíveis para a seleção de compostos mais potentes (GUEDES; DA SILVA, 2015).

Diferente dos resultados obtidos anteriormente com as fêmeas no ensaio *in vivo* I, em camundongos machos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, GIB24 a uma dose de 50 mg/kg/dia não modificou a evolução natural da infecção. Nossos resultados, corroboram com os dados publicados de Guedes e Da Silva (2015) que revelaram que camundongos fêmeas são menos vulneráveis à infecção pelo *T. cruzi* em comparação com camundongos machos. Portanto, nossos resultados também sugerem que o gênero do animal deve ser considerado nos ensaios de atividade tripanocida. Embora o regime de tratamento entre as etapas realizadas no nosso estudo seja diferente, estes resultados reforçam a importância de se comparar gêneros nos estudos de quimioterapia experimental.

A administração oral de GIB24 ou DMSO 5%, não causou efeitos indesejáveis como tremores, contorções ou convulsões, nem alteração significativa no peso ao final do quinto dia de tratamento (Figura 12). Entretanto, os parâmetros bioquímicos (Tabela 02) estavam bem alterados, inclusive no grupo controle Veículo (DMSO 5%), não permitindo estabelecer uma relação dose-efeito. Por essa razão, o experimento de toxicidade *in vivo* foi repetido, utilizando somente a dose de 50 mg/kg/dia de GIB24, diluído em água destilada estéril, comparado a um grupo não manipulado, denominado Naive. O grupo Naive foi mantido no biotério nas mesmas condições ao longo de todo o ensaio *in vivo* II e foi utilizado como um padrão de referência interno. O tratamento com GIB24 por períodos acima de 5 dias, causou mortalidade, perda da massa ponderal (Figura 15) e elevação dos níveis de séricos de ALT, sugerindo hepatotoxicidade (Tabela 03). Entretanto, os parâmetros séricos do grupo Naive também estavam elevados em comparação com os valores de

referência (BATISTA et al., 2010; SALOMÃO et al., 2010). Esses resultados sugerem que apenas a permanência dos animais no biotério, pode estar relacionada com a alteração dos parâmetros bioquímicos basais dos camundongos. Figura 14, Tabela 04.

Os ensaios de atividade tripanocida *in vivo* II com camundongos fêmeas infectadas, paralelo a um grupo não infectado para análise da toxicidade, mostraram que GIB24 50 mg/kg não foi capaz de controlar a parasitemia dos animais infectados e nem de proteger os camundongos contra a mortalidade. A divergência obtida nos resultados dos dois testes de atividade tripanocida que utilizam camundongos fêmeas, pode ser explicada pelo estado geral dos animais utilizados no modelo *in vivo* I, provenientes do mesmo lote de animais utilizados para os ensaios de toxicidade *in vivo* anterior, os quais apresentaram um aumento exacerbado em todos os parâmetros bioquímicos analisados em comparação aos valores de referência.

Desta forma, em nossas condições experimentais, a administração oral de GIB24 não foi capaz de controlar a parasitemia e nem reduzir a mortalidade de camundongos machos ou fêmeas durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, em animais saudáveis, o tratamento com GIB24 levou a perda de peso, apatia e elevação dos níveis séricos de ALT, marcador clássico para dano hepático.

Em contrapartida, Diaz e colaboradores (2014) ao avaliarem o efeito inibitório sob *T. cruzi in vitro* e *in vivo* do derivado de diamidinas (pentamidina), com terapêutica experimental similar a utilizada no ensaio *in vivo* II obtiveram resultados positivos no tratamento por 10 dias com 8 mg/kg/dia de pentamidina, que aumentou a sobrevivência média dos camundongos infectados com a cepa Y. Além disso, os autores observaram diminuição significativa do segundo pico de parasitemia, no 14º dia pós-infecção. Durante o tratamento os autores não observaram toxicidade durante os 10 dias, sendo a via de administração oral bem tolerada pelos animais. Desta forma, a necessidade de avaliação toxicológica de um composto é essencial para sua conjectura de aptidão para o desenvolvimento de um novo medicamento para o tratamento da doença de Chagas (ROMANHA, 2010).

Veiga Santos (2015) ao avaliar outro composto derivado de diamina, a SQ109, uma etilenodiamina que contém grupos N-adamantil descritos como responsáveis para a atividade antiparasitária do composto, demonstrou ser muito potente contra as formas tripomastigotas do parasita oriundas de cultura agindo na faixa de nanomolar ($CI_{50} 50 \pm 8$ nM).

A SQ109 está atualmente em ensaios clínicos de fase II para o tratamento de tuberculose sensível e resistente a medicamentos (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2019). Muito se tem discutido sobre as propriedades de SQ109, que possui uma unidade diamina ligada a uma unidade adamantil responsável pelo efeito antiparasitário. Estudos *in vitro* mostraram que SQ109 colapsa o potencial da membrana mitocondrial interna, além de alcalinizar compartimentos ácidos intracelulares, como os acidocalcisomas em formas epimastigotas de *T. cruzi* (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2019). No entanto, seu mecanismo de ação e seu efeito tripanocida *in vivo*, são pouco conhecidos.

A exemplo da atividade de SQ109 relacionadas à importantes propriedades químicas das diaminas, a lipofilicidade dos compostos é importante na busca de novos medicamentos antiprotozoários, para que, a porção hidrofóbica da molécula interaja com a membrana lipídica, permitindo a penetração da droga para o citoplasma, onde o composto irá interferir com a via metabólica das poliaminas, por exemplo. Em derivados de diaminas testados em *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania donovani*, os compostos mais polares foram mais efetivos para atravessar a membrana celular dos parasitos, aumentando o efeito inibitório na proliferação destes parasitos. Outro fator importante é o tamanho da cadeia carbônica nos compostos, quanto maior, menor a atividade tripanocida (BARBOSA, 2014).

A introdução de cadeias alquilas longas, assim como do grupo adamantil em derivados de diaminas, podem aumentar a capacidade de interação com os lipídios de membrana celular, permitindo a sua penetração e, conseqüentemente, alterar o transporte de poliaminas, assim como seu metabolismo e funcionamento de moléculas em sequência desta via em *T. cruzi* (FERNANDES *et al.*, 2013).

A facilidade e o alto rendimento de síntese da classe das diaminas já são bem caracterizados. Embora a diamina GIB24 tenha como característica uma alta hidrofobicidade, seu produto final de biossíntese na forma de um sal cloridratado permitiu sua solubilidade em água (BARBOSA, 2014). Além disso, as diaminas têm propriedade de resistência ao pH ácido do estômago, características estas que facilitam sua administração pela via oral (ESCOLANO *et al.*, 2019).

Portanto, características químico-físicas, como polaridade e lipofilicidade de uma molécula podem influenciar a atividade antiparasitária de um composto. Nesse contexto, as predições obtidas nas análises *in silico* representam uma importante

ferramenta para estudos racionais de atividade biológica e relação atividade-estrutura.

As previsões *in silico* para GIB24 mostraram bom potencial de biodisponibilidade oral e absorção intestinal, cerca de 92%, de acordo com a regra de cinco de Lipinski (Ro5). No entanto, em uma análise mais aprofundada de suas propriedades, os resultados revelaram que o composto é predominantemente hidrofílico ($\log P = -2,473$), fator que explica sua solubilidade em água.

Embora a solubilidade seja uma característica potencialmente necessária para a elaboração de um novo composto, a alta hidrofiliicidade, assim como a quantidade potencial de ligações de hidrogênio, doadores ou aceptores que o ligante possui interfere na permeabilização desse candidato a fármaco na bicamada lipídica (LIPINSKI, 2001). A alta hidrofiliicidade de GIB24 também influencia em fatores como sua baixa permeabilidade na pele na barreira hematoencefálica (BHE), conforme observado nos índices obtidos para a análise *in silico*.

GIB24 também foi classificada como uma base forte, possuindo um pKa 9,6 e dois grupos funcionais do tipo amina (primária e secundária) que ionizam em todos os valores de pH biológicos. E, portanto, compostos com alta basicidade não serão bem absorvidos devido ao baixo potencial de ligação plasmática, baixo volume distribuído e dissipação pela corrente sanguínea (SHELLEY *et al.*, 2003).

A análise *in silico* classificou GIB24 na classe IV de nível de toxicidade (não letal, mas potencialmente nocivo), com um índice de 50% de probabilidade para cardiotoxicidade, ou seja, classificado como não cardiotóxico, predição confirmada em nossos resultados pela não alteração dos níveis séricos de CK (Tabela 04). Por outro lado, as propriedades ADMET pobres são uma das falhas dos candidatos a medicamentos durante os ensaios clínicos (VAN de WATERBEEMD; GIFFORD, 2003), e GIB 24 apresentou propriedades desfavoráveis em relação ao seu potencial de absorção, distribuição e toxicidade, fatores que provavelmente influenciaram nos resultados desfavoráveis a atividade antiparasitária obtidos no modelo *in vivo* neste estudo.

Em conjunto, os resultados obtidos mostraram que GIB24 apresenta uma potente atividade tripanocida *in vitro*, superior ao do BZ. Entretanto, não foi capaz de alterar o curso da infecção aguda tanto em camundongos machos quanto fêmeas experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*. Embora a literatura comece a descrever as diferenças entre níveis de parasitemia e suscetibilidade aos tratamentos

experimentais em machos e fêmeas (GUEDES; DA SILVA *et al.*, 2015), estes resultados precisam ser avaliados com cautela.

A obtenção de análogos mais lipofílicos de GIB24 pode contribuir para um melhoramento da sua ação *in vivo*, cujo investimento se justifica diante da predição *in silico* que apontou potencial de biodisponibilidade oral e não cardiotoxicidade, requisitos para o desenvolvimento de moléculas bioativas para o tratamento da DC.

7 CONCLUSÕES

- O composto GIB24 não foi citotóxico contra células da linhagem VERO E6 nas concentrações ativas contra *T. cruzi*;
- A atividade tripanocida de GIB24 ($CI_{50} < 0,5 \mu M$) foi superior ao benzonidazol ($CI_{50} = 11 \mu M$) contra formas amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi*, apresentando um índice de seletividade maior que 180;
- A administração oral de GIB24 a 50 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos a partir do 7º dia pós infecção, alterou o curso da infecção, mas não foi capaz de suprimir a parasitemia e/ou prevenir a mortalidade em camundongos fêmeas na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*;
- A mesma dose de 50 mg/kg/dia de GIB24 com tratamento de forma oral, realizado a partir do 5º dia pós infecção não foi capaz de controlar a infecção de *T. cruzi* em ambos os grupos avaliados, não reduzindo as taxas de parasitemia e tendo duração de 11 dias para camundongos machos e 9 dias para camundongos fêmeas.
- Animais tratados com GIB24 50 mg/kg/dia não apresentaram alterações comportamentais expressivas como convulsões, tremores e contrações, mas apresentaram sinais de toxicidade como eriçamento de pelo, perda de peso, diminuição de mobilidade e elevação nos níveis séricos de ALT.
- A obtenção de análogos mais lipofílicos de GIB24 pode contribuir para um melhoramento da sua ação *in vivo*, cujo investimento se justifica diante da predição *in silico* que apontou potencial de biodisponibilidade oral e não cardiotoxicidade, requisitos para o desenvolvimento de moléculas bioativas para o tratamento da DC.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.100, p.163-172, 1999.

American Type Culture Collection (ATCC). Disponível em: <atcc.org/Products/All/CRL-1586.aspx>. Acesso em: 27 out. 2019.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZC, J.; BUIKSTRAD, J.; GUHLE, F.; ARRIAZAF, B. G.; RENIERH, C.; WITTMERS, JR. L. E.; FORNACIARI, G.; ALLISONK, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 2034–2039, 2004.

BARBOSA, G. **Síntese de derivados adamantoides diaminaados e amino Álcoois, potenciais agentes farmacológicos**. Dissertação de mestrado (Pós Graduação em saúde) - Universidade Federal de Juíz de fora, Juiz de Fora, 2014.

BARBOSA, B.S.; PRAXEDES, E.A.; LIMA, M.A.; PIMENTEL, M.M.L.; SANTOS, F.A. BRITO, P.D.; LELIS, I.C.N.G.; MACEDO, M.F. de; BEZERRA, M.B. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientia e Veterinariae**. v.45, p.1477, 2017.

BATISTA, D.G.; BATISTA, M.M.; DE OLIVEIRA G.M.; DO AMARAL, P.B.; LANNES-VIEIRA, J.; BRITTO, C.; JUNQUEIRA, A.; MARIA LIMA, M.; ROMANHA, A.J.; SALES JUNIOR, P.A.; STEPHENS, C.E.; BOYKIN, D.W.; SOEIRO, M.N.C. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.54, p.40–52, 2010.

BATISTA, D. da. G.J.; OLIVEIRA, G.M.; SOUZA, E.M. DE; HAMMER, E.R.; SILVA, P.B. DA; DALIRY, A.A.; JULIANNA S.B.; CONSTANÇA R., LIU, A.C.M.; ZONGYING, F.; ABDELBASSET, K.A.; ARVIND, B.; DAVID, W.; SOEIRO, M. DE N.C. In Vitro and In Vivo Investigation of the Efficacy of Arylimidamide DB1831 and Its Mesylated Salt Form - DB1965 - against *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One**, v.7, n.1, 2012.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v.156, p. 1-16, 2016.

BENÍTEZ, D.; MEDEIROS, A.; FIESTAS, L.; PANOZZO-ZENERE, E.A.; MAIWALD, F.; PROUSIS, K.C.; ROUSSAKI, M.; CALOGEROPOULOU, T.; DETSI, A.; JAEGER, T.; ŠARLAUSKAS, J.; MAŠIČ, L.P.; KUNICK, C.; LABADIE, G.R.; FLOHÉ, L.; COMINI, M.A. Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting 128 Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.10, p.4617, 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v.373, n.5, p.456-466, 2015.

BANERJEE, P.; ECKERT, A.O.; SCHREY, A.K.; PREISSNER, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v.46, p. 257-263, 2018.

BRANQUINHA, M.H.; OLIVEIRA, S.S.; SANGENITO, L.S.; SODRE, C.L.; KNEIPP, L.F.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L. Cruzipain: An Update on its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Currentlly Medicine Chemesthry**, v. 22, p.225-35, 2015.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. Terapêutica experimental na doença de Chagas. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, v. 2, p.379-388, 2000.

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

BONA, E, de; LIDANI, K.C.F.; BAVIA, L.; OMIDIAN, Z.; GREMSKI, L.H.; SANDRI, T.L.; DE MESSIAS REASON, I.J. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v.9, p.1-8, 2018.

BONNEY, K. Doença de Chagas no século 21: um sucesso de saúde pública ou uma ameaça emergente? **Parasite**, v.21, p.11-21, 2014.

BONNEY, K.M.; ENGMAN, D.M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **The American Journal of Pathology**, v.185, n.6, p.1537-1547, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. Boletim Epidemiológico**. 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

CARRILLO, C.; CANEPA, G.E.; ALGRANATI, I.D.; PEREIRA, C.A. Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.344, n.3, p. 936-940, 2006.

CARRILLO, C.; CEJAS, S.; GONZALEZ, N.S.; ALGRANATI, I.D. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. **FEBS Letters**, v.454, p.192–196, 1999.

CASERO, R.A. JR.; MURRAY, S.T.; PEGG, A.E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v.18, p.681-695, 2018.

CEBALLOS, I.L. A.; OLIVERA, M.J. Reactivation of Chagas disease in a heart transplant patient infected by sylvatic *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.52, p.18-52, 2019.

CHADALAWADA, S.; SILLAU, S.; ARCHULETA, S.; MUNDO, W.; BANDALI, M.; PARRA-HENAO, G.; RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; VILLAMIL-GOMEZ, W.E.; SUÁREZ, J.A.; SHAPIRO, L.; HOTEZ, P. J.; WOC-COLBURN, L.; DESANTO, K.; RASSI JR, A.; FRANCO-PAREDES, C.; HENAO-MARTÍNEZ, A.F. Risco de Cardiomiopatia Crônica entre Pacientes com Fase Aguda ou Forma Indeterminada da Doença de Chagas: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise. **JAMA Netw Open**, v.3, p.1-15, 2020.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v.20, p.22-35, 2015.

CHATELAIN, E.; SCANDALE, I. Modelos animais da doença de Chagas e seu valor translacional para o desenvolvimento de medicamentos. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.15, p.1381-1402, 2020.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G. AdmetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.52, p.3099-3105, 2012.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.113-122, 2007.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.3, p.277-282, 2020.

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

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

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A.; JUNQUEIRA, A.C.V. Ecoepidemiologia, breve história e controle da doença de Chagas nos países endêmicos e o novo desafio para os países não endêmicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, n.7, 2014.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. 6-7, 2014.

DAFFARA C. M.; EGER, I. Trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of diamine derivatives. *In: XXX ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF PROTOZOOLOGY AND XLI ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH ON CHAGAS DISEASE*, 2014, Caxambu (MG), **Anais da XXX Annual Meeting of the Society of protozoology and XLI Annual Meeting on Basic Research on Chagas Disease**. São Paulo: Editora da SBPZ, 2014, p. 198-198.

DAVANÇO, M. G. **Farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação**

prolongada, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2015. Disponível em: http://www.fcfar.unesp.br/arquivos/link/20151118092213marcelo_gomes_davanco_me.pdf. Acesso em: 17 mar. 2020

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Report**, p. 42-71, 2016.

DE SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.1, p.17-36. 1999.

DIAS, J.C.P.; LIMA, L.D.G.C.; ALBAJAR-VIÑAS, M.M.; SILVA, P.; ALVES, R.A.; ALVES, R.N.; COSTA, V.M da. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, p.87-90, 2016.

DIAS, J.C.P.; RAMOS Jr, N.A.; NOVAES, A.G.; LUQUETI, E.D.; SHIKANAI-YASHUDA, A.; APARECIDA, M.; COURA, J.R.; TORRES, R.M.; MELO, J.R. da C.; ALMEIDA, E.A. de O Jr.; SILVEIRA, A.C.; REZENDE, J.M de.; SILVEIRA, W. de; REZENDE, A.C.; PINTO, J.M. de; SCALABRINI, F.; FERREIRA, A.; RASSI, W.; FRAGATA, F.A.; ABÍLIO, A.; SOUSA, A.S de; CORREIA, F.D.; JANSEN, A.M.; ANDRADE, G.M.; QUEIROZ, B.; CONSTANÇA, F. de P. de C.; PINTO, A.Y.D.N.; RASSI Jr, A.; CAMPOS, D.E.; ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, S.E.; CHIARI, E.; HASSLOCHER-MORENO; ALEJANDRO, M.; MOREIRA, E.F.; MARQUES, D.S de O.; SILVA, E.L.; MARTIN-NETO, J.A.; GALVÃO, L.M.D.C.; XAVIER, S.S.; VALENTE, S.A.D.S.; CARVAKGI, N.B.; CARDOSO, A.V.; SILVA, R.; ALBUQUEURQUE, E.C.V.M.D.; VIVALDINI, S.M.; OLIVEIRA, S.M.; VALENTE, V.D.C.; LIMA, M.M.; VIEIRA, A.R. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86. 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000500007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 Mar. 2021.

DUSCHAK V,G. Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease in the Last 15 Years-Period. Recent Pat. **Antiinfected Drug Discovery** p. 1174-173, 2016.

DIAZ, A.M.V.; MIRANDA, M.R.B.; ESTRADA, C.C.; REIGADA, B.; MAYA, D.J.; PEREIRA, C.A.B.; MUNOZ, L.R. Pentamidine exerts *in vitro* and *in vivo* anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropical**, v.134 p.1–9, 2014.

DINIZ, L.F.; URBINA, J.A.; DE ANDRADE, I.M.; MAZZETI, A.L.; MARTINS, T.A.; CALDAS, I.S.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M.T. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.7, p.23-67, 2013.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferente derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: Avaliação *in vitro* e *in***

vivo. 1v. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Florianópolis SC, p.105, 2010.

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

FERNANDES, F.S.; JUNIOR, C.O.R.; FERNANDES, T.S.; SILVEIRA, L.S.; REZENDE, C.A.M.; DE ALMEIDA, M.V. Anthelmintic effects of alkylated diamines and amino alcohols against *Schistosoma mansoni*. **Biomedical research international**, p.1-9, 2013.

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

FLOHÉ, L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, v.302, p.216– 220, 2012.

FILIGHEDDU. M.T.; GÓRGOLAS. M.; RAMOS. J.M.; Orally-transmitted Chagas disease. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicine Clininical (Barc)**. v.148, p.125-131, 2017.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropical**, v.115, p.1-2, 2010.

GUEDES-DA-SILVA, F.H.; BATISTA, D.G.; DA SILVA, C.F.; MEUSER, M.B.; SIMÕES-SILVA, M.R.; DE ARAÚJO J.S.; FERREIRA, C.G.; MOREIRA, O.C.; BRITTO, C.; LEPESHEVA, G.I.; SOEIRO, M.D.E.N. Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.75 p.64-70, 2015.

GURU, P.Y.; AGRAWI, A.K.; SINGHA, U.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in Leishmania donovani infections using tuftsin-bearing liposomes as drug vehicles. **Federation of uropean Biochemical Societies**, n.1, v.2, p. 204-208, 1989.

JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.; ROQUE, A.L.R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.11, p.502, 2018.

LANA, M.; MARTINS-FILHO, O. A. Revisiting the Posttherapeutic Cure Criterion in Chagas Disease: Time for New Methods, More Questions, Doubts, and Polemics or Time to Change Old Concepts? **BioMedical Research International**, v.2015, p.1-10, 2015.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of Dysoxylum binectariferum and its fractions against Leishmania donovani. **Phytomedicine**, v.14, n.1, p.36-42, 2007.

LEGARDA CEBALLOS, A. L. *In vitro* and *in vivo* evaluation of 2 aminoalkanol and 1, 2- alkanediamine derivatives against Strongyloides venezuelensis. **Parasites & Vectors**, v.9, p.364-372, 2016.

LI, GUIGEN.; KOTTI, SAIABABU.; S.R.S.; TIMMONS. Chemistry biological drug discovery, v.67,101-104, 2006.

LOOSDRECHT, A.A.; NENNEL, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGESNHUIJSEN, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v.141, p.15-22, 1991.

LUK, G.D.; CASERO, R.A. Polyamines in normal and cancer cells. **Adv Enzyme Regulation**, v.26, p.91-105, 1987.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.4, p.1-16, 2002.

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

MARTÍN-ESCOLANO, R.; MOLINA-CARREÑO, D.; DELGADO-PINAR, E.; MARTIN-MONTES, A.; CLARES, M.P.; MEDINA-CARMONA, E.; PITARCH-JARQUE, J.; MARTÍN-ESCOLANO, J.; ROSALES, M.J.; GARCÍA-ESPAÑA, E.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; MARÍN, C. New polyamine drugs as more effective antichagas agents than benznidazole in both the acute and chronic phases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p.27-46, 2019.

MARTINEZ, F.; PERNA, E.; PERRONE, S.V.; LIPRANDI, A.S. Chagas Disease and Heart Failure: An Expanding Issue Worldwide. **European Cardiology Review**, v.14, n.2, p.82-88, 2019.

MARTINS, A.V. GOMES, A.P.; GOMES de M.E.; LOPES, R.F.J.; SANTANA L.A.; DE A.O.M.G.; GELLER, M. de F.S.; RAMON, R.V.R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Biology of Trypanosoma cruzi: An update. **Asociación Colombiana de Infectología**, v.16, n.1, p.45-58, 2012.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of 135 natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.601-620, 2007.

MENDONÇA, A.D. **Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos**. Dissertação Mestrado em Ciência de Alimentos Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2009.

MEZIANE-CHERIF, D.; AUMERCIER, M.; KORA, I.; SERGHERAERT, C.; TARTAR, A.; DUBREMETZ, J.F.; OUAISSI, M.A. Trypanosoma cruzi: immunolocalization of trypanothione reductase. **Experimental Parasitology**, v.79, n.4, p.536-541, 1994.

MOLINA, I.; GÓMEZ, I.; PRAT, J.; 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. **New England Journal of Medicine**, v.15, p.1899-908, 2014

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v.37, p.966, 2014.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. Update Chagas disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.34, p.2-8. 2016.

MORGAN, D.M. L. Polyamines. **Molecular Biotechnology**, v.11, p.229–250, 1999.

MORILLO, C.A.; MARIN- NETO, J.A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, J.A.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; CONNOLLY, S.J.; YUSUF, S. For the BENEFIT Investigators* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v.373, p.1295-1306, 2015.

MOSCATELLI, G.; MORONI, S.; GARCÍA BOURNISSEN, F.; GONZÁLEZ, N.; BALLERING, G.; SCHIJMAN, A.; CORRAL, R.; BISIO, M.; FREILIJ, H.; ALTCHER, J. Longitudinal follow up of serological response in children treated for Chagas disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.13, n.8, 2019.

MOTA, A.F.; DAMASCENO, R.F.; MONTEIRO-JUNIOR, R.S.; OLIVEIRA, I.A.C. de; PRATES, T.E.C.; NUNES, M.C.P.; HAIKAL, D.S. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, v.27, p.354-362, 2019.

MOURA, D.F da; ROCHA, T.A.; BARROS, D.de M.; SILVA da M.M.; FERREIRA, S.A. de O.; MARTINS R.D.; SILVA, da V.S. Avaliação ponderal e screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol / ponderal evaluation and hypocratic screening of nerolidol treated mice. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.5172- 5183, 2020.

MÜLLER, S.; COOMBS, G.H.; WALTER, R.D. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy, **Trends in Parasitology**, v.17, p.242-249, 2001.

NÓBREGA, A. A da. Carga de doença associada à cardiomiopatia chagásica no Brasil, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/18466>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

NOGUEIRA, F.; RUIZ, J.C.; ROBELLO, C.; ROMANHA, A.J.; MURTA, S.M. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in

Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitology Research**, v.104, p.835-844. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2019. Disponível em: <www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=a> acesso em: 27 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2020. Disponível em: <www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743> Acesso em: 27 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases -Third WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: WHO, 2015.

OLMO, F.; CUSSÓ, O.; MARÍN, C.; ROSALES, M.J.; URBANOVÁ, K.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COSTAS, M.; RIBAS, X.; SÁNCHEZ-MORENO, M. *In vitro* and *in vivo* identification of tetradentated polyamine complexes as highly efficient metallodrugs against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v.164, p.20-30, 2016.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v.391, n.10115, p.82-94, 2018.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-arginina-dependente supressão da apoptose em *Trypanosoma cruzi*: contribuição das vias do óxido nítrico e poliamina. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.98, p.7301-7306, 2001.

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

RASSI, J.A.; RASSI, A.; RASSI, S.G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v.115, p.1101-1108, 2007.

REIGADA, C.; SAYÉ, M.; VERA, E.V.; BALCAZAR, D.; FRACCAROLI, L.; CARRILLO, C.; MIRANDA, M.R.; PEREIRA, C.A. *Trypanosoma cruzi* Polyamine Transporter: its role on parasite growth and survival under stress conditions. **The Journal of Membrane Biology**, v.6, p.1-17, 2016.

REIGADA, C.; SAYÉ, M.; PHANSTIEL, O.; VALERA-VERA, E.; MIRANDA, M.R.; PEREIRA, C. Identificação de inibidores do transporte de poliamina do *Trypanosoma cruzi* por reaproveitamento computacional de drogas. **Frontiers Medicine (Lausanne)** v.6, p.256, 2019.

RIBEIRO, V.; DIAS, N.; PAIVA, T.; HAGSTRÖM-BEX, L.; NITZ, N.; PRATESI, R.; HECHT, M. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease.

International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance, v.12, p.7-17, 2020.

ROBERTS, S.; ULLMAN, B. Parasite Polyamines as Pharmaceutical Targets. **Current Pharmaceutical Design**, v.23, n.23, p.325-3341, 2017.

ROMANHA, A.J.; DE CASTRO, S.L.; SOEIRO, M.D.C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS, J.; ROMERO, L.H.; BAHIA, L.I.; TEREZINHA, M.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W. E.A, DE ARAÚJO, Z. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n. 2 p. 233-238, 2010.

SALES JÚNIOR, P.A.; REZENDE JÚNIOR, C.O.; LE HYARIC, M.; ALMEIDA, M.V.; ROMANHA, A.J. The *in vitro* activity of fatty diamines and amino alcohols against mixed amastigote and trypomastigote *Trypanosoma cruzi* forms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, n.3, p.362-364, 2014.

SALVATELLA R.; IRABEDRA. P.; CASTELLANOS. L.G. Interrupção da transmissão vetorial por vetores nativos e "a arte do possível". **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, p.122-125, 2014.

SALOMÃO, K.; DE SOUZA, E.M.; CARVALHO S.A., DA SILVA E.F.; FRAGA, C.A. *In vitro* and *in vivo* activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazones derivatives of megalin against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.54, p.23-31, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, M.; MARÍN, C.; NAVARRO, P.; LAMARQUE, L.; GARCÍA-ESPAÑA, E.; MIRANDA, C.; HUERTAS, O.; OLMO, F.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; PITARCH, J.; ARREBOLA, F. *In vitro* and *in vivo* trypanosomicidal activity of pyrazole-containing macrocyclic and macrobicyclic polyamines: their action on acute and chronic phases of Chagas disease. **Journal of Medicine and Chemistry**. v.42, p.31-43, 2012.

Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (SVS/MS). **Doença de Chagas aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016**. Boletim Epidemiológico, v.50, n.2, 2019.

SEGUEL, V.; CASTRO, L.A.; REIGADA, C.B.; CORTES, L.A.C.; DÍAZ, M.V.; MARIANA, R.; MIRANDA, B.; PEREIRA, C.A.B.; LIEPER, M.A.; CAMPOS-ESTRADA, C.A.; MORELLO, A.; ULRIKE, K.C.; MAYA J.D.; LOPEZ, M.R. Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect *in vitro*, and lacks of synergy *in vivo*: Implications about the polyamine transport as an *anti-Trypanosoma cruzi* target. **Experimental Parasitology**, v.171, p.23-32, 2016.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics,

IC50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.813-823, 1995.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v.20, p.201-210, 1953.

SHELLEY, J.C.C.A.; FRYE, L.L.; GREENWOOD, J.R.; TIMLIN M.R.; UCHIYAMA, M. (2007). Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for druglike molecules. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.21, p.681-691, 2007.

SIMÕES, M.V.; ROMANO, M.M. D.; SCHMIDT, A.; MARTINS, K.S.M.; MARIN-NETO, J.A.; et al. Cardiomiopatia da Doença de Chagas. **Int. J. Cardiovasc. Sci.**, v.31, n.2, p.173-189, 2018.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica, 8 ed.** Editora LTC, v.2, 224p., 2006.

STANAWAY, J.D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global Heart**, v.10, n.3, p.139-144, 2015.

STAUFFERT, D.; SILVEIRA, M.F. da.; MESENBURG, M.A.; MANTA, A.B.; DUTRA, A. da S.; BICCA, G.L. de O.; VILLELA, M.M. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*/HIV coinfection in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, n.2, p.180-184, 2017.

TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Spermid polyamine in hydrophobic and hydrophilic interactions. **Journal of Chromatography B**, v.781, p.107-1049, 2002.

TORRICO, F. Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Society. **Tropical Medicine and Hygiene**, p.13-17, 2013.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.472-481, 2001.

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

VÁZQUEZ, K.; PAULINO, M.; SALAS, C.O.; ZARATE-RAMOS, J.J.; VERA,B.; RIVERA, G. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti-*Trypanosoma cruzi* Drugs. **Mini Review Medicine Chemistry**, v. 17, p.939-946, 2017.

VAN de WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in Silico Modeling,for Prediction Paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, p.192-204, 2003.

VILLAR, J.C.; PEREZ, J.G.; CORTES, O.L.; RIASTE, A.; PEPPER, M.; MARIN-NETO, J.A.; GUYATT, G.H. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic

Trypanosoma cruzi infection (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.1, 2002.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (American Trypanosomiasis), 2019. Disponível em: <who.int/chagas/en/>.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. **Technical Report Series**, v.905, p.109, 2002.

WHO (World Health Organization). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas disease. **Technical Report Series**, v.905, p.85, 2019.

WILLERT, E.K.; PHILLIPS, M.A. Regulation and function of polyamines in African trypanosomes. **Trends in Parasitology**, v.28, n.2, p.66-72, 2012.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, v.325, p.289-297, 1997.

YAMANAKA, C.N.; GIORDANI, R.B.; REZENDE J.R.C.O.; EGER, I.; KESSLER, R.L.; TONINI, M.L.; MORAES, M.H.; ARAÚJO, D.P.; ZUANAZZI, J.A.; ALMEIDA, M.V.; STEINDEL, M. Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v.82, p.697-704, 2013.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.1, p.159-164, 1999.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* Subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infectology Genetic Evolution**, v.2, p.40-53, 2012.