

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS

LARA MARIA MEDEIROS LEME

POTENCIAL ATIVIDADE DE FÁRMACOS COMBINADOS SOBRE
FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

CAMPO GRANDE - MS

2025

LARA MARIA MEDEIROS LEME

**POTENCIAL ATIVIDADE DE FÁRMACOS COMBINADOS SOBRE
FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPGDIP, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira

CAMPO GRANDE- MS

2025

TERMO DE APROVAÇÃO

LARA MARIA MEDEIROS LEME

**POTENCIAL ATIVIDADE DE FÁRMACOS COMBINADOS SOBRE
FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPGDIP, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Campo Grande, MS, _____ de _____ de 2025

Comissão Examinadora:

Profª. Drª. Alda Maria Teixeira Ferreira - UFMS

Profª. Drª. Aline Etelvina Casaril Arrua - UFMS

Prof. Dr. Wagner de Souza Fernandes - UFMS

Profª. Drª. Inês Aparecida Tozetti (Suplente) - UFMS

Profª. Drª. Cacilda Tezelli Junqueira Padovani (Suplente) - UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado meus passos em cada momento dessa etapa.

Agradeço ao meu esposo Alexandre, minha mãe Helena e meu irmão Felipe, por serem meus maiores apoiadores e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês nenhuma conquista tem sentido.

Agradeço a todos meus amigos que viveram comigo esse momento, me dando forças e sempre torcendo por mim. Agradeço em especial as minhas amigas Caroline e Thaissa, pois sua amizade e incentivo foram decisivos para eu chegar até aqui.

Agradeço a minha orientadora Alda pela paciência, pelo conhecimento compartilhado e por ter sido símbolo de calma e leveza nos momentos de ansiedade. Serei eternamente grata pelo carinho e pela sua dedicação em tornar essa fase um momento de crescimento e aprendizado genuíno.

Agradeço a toda equipe *GT. cruzi* e LabImunoBio pela parceria, amizade e carinho. Kênia, Flávia e Carlos, obrigada pela amizade e por dividirem as alegrias e perrengues da pós-graduação. Lis, Luiz, Pedro's, Rafa e Bruna, muito obrigada pelo apoio e auxílio sempre que necessário. Vocês foram essenciais nessa jornada, e cada um deixou uma marca nesse trabalho e na minha vida.

Agradeço a UFMS e ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PPGDIP) pela oportunidade de crescimento, pelo conhecimento adquirido e pelas memórias que guardarei com muito carinho.

A todos vocês, minha profunda gratidão.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, representa um grande risco à saúde na América Latina. Os tratamentos atuais, benznidazol e nifurtimox, são limitados por efeitos colaterais significativos e toxicidade. Para encontrar melhores soluções, o reposicionamento de fármacos tornou-se uma abordagem promissora. Pesquisas recentes, baseadas em achados *in silico* e testes subsequentes, mostram que o nitrato de oxiconazol e o lansoprazol são eficazes *in vitro* contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c, despertando interesse na exploração de seus efeitos combinados, bem como sua associação com o benznidazol. Este estudo avaliou o efeito *in vitro* da combinação do fármaco nitrato de oxiconazol com os fármacos lansoprazol e benznidazol, sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Pesquisa experimental usando testes *in vitro* foi conduzida com uma população clonal da cepa *T. cruzi* Dm28. O estudo avaliou a eficácia das combinações, testando múltiplas proporções. A viabilidade celular foi medida após 72 horas de incubação com as combinações de medicamentos, usando método colorimétrico com MTS e PMS. Com base nos resultados obtidos, foram determinados o Índice de Combinação e o Índice de Redução de Doses das combinações. A citotoxicidade das combinações dos fármacos sobre células animais foi determinada através de teste com MTT e realizado o cálculo do Índice de Seletividade das combinações. No ensaio de viabilidade com MTS, o nitrato de oxiconazol apresentou uma CI_{50} de 91,1 μ M, o benznidazol teve uma CI_{50} de 23,5 μ M e o lansoprazol não mostrou efeito na viabilidade celular. A combinação de nitrato de oxiconazol:lansoprazol apresentou os seguintes resultados para cada proporção: 1:3 CI_{50} 15,1 μ M, 1:1 CI_{50} 49,6 μ M e 3:1 de aproximadamente 45,7 μ M. Diferenças na CI_{50} também foram observadas nas diferentes combinações de benznidazol:nitrato de oxiconazol, com os seguintes resultados: 1:3 CI_{50} 52,2 μ M, 1:1 CI_{50} 19,7 μ M, 3:1 CI_{50} 7,1 μ M. Todas as proporções da combinação de nitrato de oxiconazol:lansoprazol tiveram efeito sinérgico, enquanto na combinação de nitrato de oxiconazol:benznidazol foram verificadas proporções com efeito de antagonismo e proporções com efeito de sinergismo. O cálculo do Índice de redução de doses verificou que o lansoprazol foi capaz de reduzir em mais de 28 vezes a concentração de nitrato de oxiconazol e a combinação de benznidazol e nitrato de oxiconazol promoveu uma diminuição na concentração de benznidazol em aproximadamente 13 vezes em todas as concentrações inibitórias. A combinação de nitrato de oxiconazol e benznidazol apresentou citotoxicidade elevada, enquanto a combinação de nitrato de oxiconazol com lansoprazol apresentou citotoxicidade inferior a dos fármacos isolados em duas das três proporções, possibilitando o estabelecimento de um regime de tratamento eficaz com menos efeitos colaterais, o que pode aumentar a adesão do paciente e, conseqüentemente, melhorar as taxas de sucesso do tratamento. Adicionalmente, os resultados encontrados demonstram o potencial de reduzir as doses dos medicamentos quando usados em combinação. Essa análise contribuiu para a descoberta de novas associações terapêuticas eficazes para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *In silico*. Reposicionamento de Fármacos. Tripanossomíase americana.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, represents a major health risk in Latin America. Current treatments, benznidazole and nifurtimox, are limited by significant side effects and toxicity. To find better solutions, drug repositioning has become a promising approach. Recent research, based on *in silico* findings and subsequent tests, shows that oxiconazole nitrate and lansoprazole are effective *in vitro* against the epimastigote forms of *T. cruzi* Dm28c, sparking interest in exploring their combined effects, as well as their association with benznidazole. This study evaluated the *in vitro* effect of the combination of oxiconazole nitrate with lansoprazole and benznidazole on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental research using *in vitro* tests was conducted with a clonal population of the *T. cruzi* Dm28 strain. The study assessed the efficacy of the combinations by testing multiple proportions. Cell viability was measured after 72 hours of incubation with drug combinations using a colorimetric method with MTS and PMS. Based on the obtained results, the Combination Index and Dose Reduction Index were determined for the combinations. The cytotoxicity of the drug combinations on animal cells was determined through MTT assay, and the Selectivity Index of the combinations was calculated. In the viability assay with MTS, oxiconazole nitrate showed an IC_{50} of 91.1 μ M, benznidazole had an IC_{50} of 23.5 μ M, and lansoprazole showed no effect on cell viability. The combination of oxiconazole nitrate:lansoprazole presented the following results for each proportion: 1:3 IC_{50} 15.1 μ M, 1:1 IC_{50} 49.6 μ M, and 3:1 approximately 45.7 μ M. Differences in IC_{50} were also observed in the different combinations of benznidazole:oxiconazole nitrate, with the following results: 1:3 IC_{50} 52.2 μ M, 1:1 IC_{50} 19.7 μ M, and 3:1 IC_{50} 7.1 μ M. All proportions of the oxiconazole nitrate:lansoprazole combination showed a synergistic effect, while in the oxiconazole nitrate:benznidazole combination, proportions with antagonistic and synergistic effects were observed. The Dose Reduction Index calculation verified that lansoprazole was capable of reducing the concentration of oxiconazole nitrate by more than 28 times, and the combination of benznidazole and oxiconazole nitrate reduced the concentration of benznidazole by approximately 13 times at all inhibitory concentrations. The combination of oxiconazole nitrate and benznidazole showed high cytotoxicity, while the combination of oxiconazole nitrate with lansoprazole presented lower cytotoxicity than the isolated drugs in two of the three proportions, enabling the establishment of an effective treatment regimen with fewer side effects, which may increase patient adherence and consequently improve treatment success rates. Additionally, the results demonstrate the potential to reduce drug doses when used in combination. This analysis contributes to the discovery of new effective therapeutic associations for the treatment of Chagas disease.

Keywords: American Trypanosomiasis. Chagas disease. Drug repositioning. *In silico*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinal de Romãña.....	15
Figura 2 - Fórmula estrutural dos fármacos utilizados para tratamento da doença de Chagas.	17
Figura 3 - Estrutura química do nitrato de oxiconazol.....	25
Figura 4 - Estrutura química do lansoprazol.....	27
Figura 5 - Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 7 - Isoblograma ilustrando os efeitos da combinação entre os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 8 - Isoblograma ilustrando os efeitos da combinação entre os fármacos benznidazol e nitrato de oxiconazol sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 9 - Índices de redução das diferentes proporções das combinação de lansoprazol e nitrato de oxiconazol testadas sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	40
Figura 10 - Índices de redução das diferentes proporções das combinação de benznidazol e nitrato de oxiconazol testadas sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- CI_{50} dos fármacos não combinados testados <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 72 horas de exposição.....	37
Tabela 2- CI_{50} , CI_{25} , CI_{75} e CI_{90} dos fármacos combinados testados <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 72 horas de exposição.....	37
Tabela 3 - Valores dos índices de combinação, classificados segundo Chou (2006), sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	38
Tabela 4 - Citotoxicidade (CC_{50}) dos fármacos não combinados testados <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 72 horas de exposição.....	41
Tabela 5 - Citotoxicidade (CC_{50}) e índice de seletividade (IS) dos fármacos combinados testados <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 72 horas de exposição.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC ₅₀	Concentração Citotóxica Média
CI	Concentração Inibitória
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
DC	Doença de Chagas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTUs	<i>Discrete Typing Units</i>
EC	<i>Enzyme Commission Number</i>
IBP	Inibidor da Bomba de Prótons
IC	Índice de Combinação
IRD	Índice de Redução de Dose
IS	Índice de Seletividade
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MTS	<i>3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio</i>
MTT	<i>3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PF	Paraformaldeído
PMS	Metossulfato de Fenazina
SBF	Soro Bovino Fetal
TTD	<i>Therapeutic Targets Database</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Doença de Chagas.....	13
2.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.1.2 Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
2.1.3 Formas de transmissão.....	17
2.1.4 Formas Clínicas da Doença de Chagas.....	18
2.1.5 Epidemiologia.....	20
2.1.6 Tratamento.....	21
2.2 Novos candidatos quimioterápicos para o tratamento da Doença de Chagas.....	23
2.2.1 Metabolismo Lipídico.....	24
2.2.2 Metabolismo Energético.....	25
2.3 Reposicionamento de Fármacos.....	26
2.3.1 Análises <i>in silico</i>	27
2.3.2 Nitrato de Oxiconazol.....	28
2.3.3 Lansoprazol.....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Características do Estudo.....	33
4.2 Fármacos selecionados para o estudo.....	33
4.3 Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
4.4 Ensaio de viabilidade com MTS.....	33
4.5 Ensaio de Combinação.....	34
4.6 Determinação do Índice de Combinação (IC) e Índice de Redução de Dose (IRD).....	35
4.7 Citotoxicidade em células animais e índice de seletividade.....	35
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Efeito da combinação dos fármacos.....	37
5.2 Índice de combinação.....	38
5.3 Índice de Redução de Dose.....	40
5.4 Análise de citotoxicidade e Índice de Seletividade.....	41
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	47
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	48
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	50

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) representam um grupo de doenças com maior prevalência em áreas tropicais, que afetam principalmente comunidades empobrecidas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que anualmente mais de um bilhão de pessoas são acometidas por essas enfermidades, causando significativos impactos sociais e econômicos nessas populações, contribuindo para a dificuldade no desenvolvimento e potencializando o quadro de desigualdade. Embora as evidências demonstrem a importância de pesquisas relacionadas a essas doenças, os investimentos no desenvolvimento de novas opções terapêuticas ainda são insuficientes (de Sousa *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2022; WHO, 2002).

Dentre as 20 doenças incluídas no grupo da DTNs, a doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase americana tem grande relevância epidemiológica, com uma estimativa de seis a oito milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. Ela tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo transmitida ao hospedeiro vertebrado principalmente através do contato com fezes ou urina de triatomíneos (inseto vetor) infectados, podendo ocorrer também por via oral, transfusão sanguínea ou transplacentária. Inicialmente a doença era encontrada principalmente nas áreas rurais da América Latina, porém com o aumento dos deslocamentos populacionais e a urbanização, houve um aumento dos casos nos continentes não endêmicos, como Europa, América do Norte e África (PAHO, 2023; WHO, 2002, 2024a).

A DC apresenta curso clínico bifásico, sendo dividida em fase aguda e crônica. A infecção aguda, na maioria dos casos, apresenta-se assintomática. Os casos agudos sintomáticos ou oligossintomáticos cursam com febre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), chagoma de inoculação, miocardite e meningoencefalite. A evolução da fase crônica da doença é lenta, podendo evoluir para 3 principais formas: cardíaca, digestiva ou mista (Coura, 2003; de Sousa *et al.*, 2024; Pérez-Molina; Molina, 2018).

Atualmente, existem apenas duas opções terapêuticas para o tratamento da DC - benznidazol e nifurtimox, sendo que no Brasil o fármaco de escolha é o benznidazol. Esses medicamentos apresentam altas taxas de efeitos adversos e toxicidade sistêmica. A taxa de cura dos casos agudos após a terapia medicamentosa é de 80%, porém apenas 20% dos casos

crônicos apresentam cura. Foram também relatados casos de resistência do *T. cruzi* a essas drogas. Esses fatores associados impedem com que esses fármacos preencham os requisitos necessários para serem considerados eficientes segundo os critérios da OMS, justificando a necessidade da pesquisa de outras alternativas terapêuticas para o tratamento da DC (Coura, 2009; Urbina, 2010).

Embora exista o envolvimento de diversos grupos de pesquisa, os avanços no desenvolvimento de drogas que apresentem características ideais, como alta eficácia e baixos índices de toxicidade, ainda não indicaram uma solução efetiva para essa questão. Como consequência, embora medidas de controle para prevenção da doença sejam aplicadas no país, a DC é considerada uma importante causa de morte no Brasil (Brasil, 2024; de Souza, 2010; Martins-Melo; Castro; Werneck, 2021).

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo que necessita de grande investimento financeiro e requer um longo período de testes. Na busca de acelerar a descoberta de princípios ativos que sejam efetivos no tratamento de doenças negligenciadas e raras, o reposicionamento de fármacos tem sido estrategicamente utilizado, baseando-se na busca de novos usos para drogas já aprovadas, com perfis de segurança e farmacocinética já conhecidos. Outra estratégia que vem sendo utilizada é avaliação de combinações de compostos já conhecidos na busca de sinergia, potencializando os resultados farmacológicos (Andrews; Fisher; Skinner-Adams, 2014; Ashburn; Thor, 2004; Ekins *et al.*, 2011).

A estratégia do estudo *in silico* para a investigação da possibilidade de reposicionamento de fármacos tem sido utilizada como forma de direcionar os ensaios *in vitro* para a investigação de atividade anti-*T. cruzi*. Com base em dados obtidos recentemente, os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol apresentaram atividade *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (Garcia, 2022), tornando-se oportuna a pesquisa dos efeitos da combinação de ambos os fármacos, buscando um possível sinergismo, com potencialização dos efeitos contra o agente etiológico da DC.

O nitrato de oxiconazol é um derivado imidazólico sintético. É um medicamento antifúngico de amplo espectro com atividade fungicida e fungistática, utilizado para o tratamento de infecções causadas por dermatófitos patogênicos e leveduras. Sua atividade é relacionada primariamente a inibição da biossíntese de ergosterol a partir de seu precursor

lanosterol, que é um componente fundamental para a estabilidade da membrana celular de diversos microrganismos, assim como *T. cruzi*. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da enzima do citocromo P450 lanosterol 14- α -demetilase (*Enzyme Commission Number* - EC: 1.14.14.154), resultando na instabilidade da membrana e aumento de permeabilidade (Drugbank, 2024b; High; Fitzpatrick, 2012).

O lansoprazol é um fármaco da classe dos inibidores da bomba de prótons, classificado como derivado benzimidazólico. Ele atua inibindo seletivamente a bomba de prótons das células parietais, causando a inibição da secreção de ácido gástrico. É utilizado no tratamento de úlceras gastrointestinais, no refluxo gastroesofágico, na erradicação da *Helicobacter pylori*, entre outras patologias que envolvam excesso de secreção ácida (Barradell; Faulds; McTavish, 1992; Drugbank, 2024a; Matheson; Jarvis, 2001). Em tripanossomatídeos possui o potencial de inibir uma enzima homóloga a H⁺-ATPase humana que é fundamental para a manutenção da homeostase do parasito (Gupta *et al.*, 2022).

Diante da problemática apresentada e baseando-se nos resultados promissores obtidos, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c da combinação do fármaco nitrato de oxiconazol com os fármacos lansoprazol e benznidazol, utilizando a estratégia de reposicionamento de fármacos como ferramenta para a descoberta de novas associações terapêuticas eficazes para o tratamento da DC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Chagas

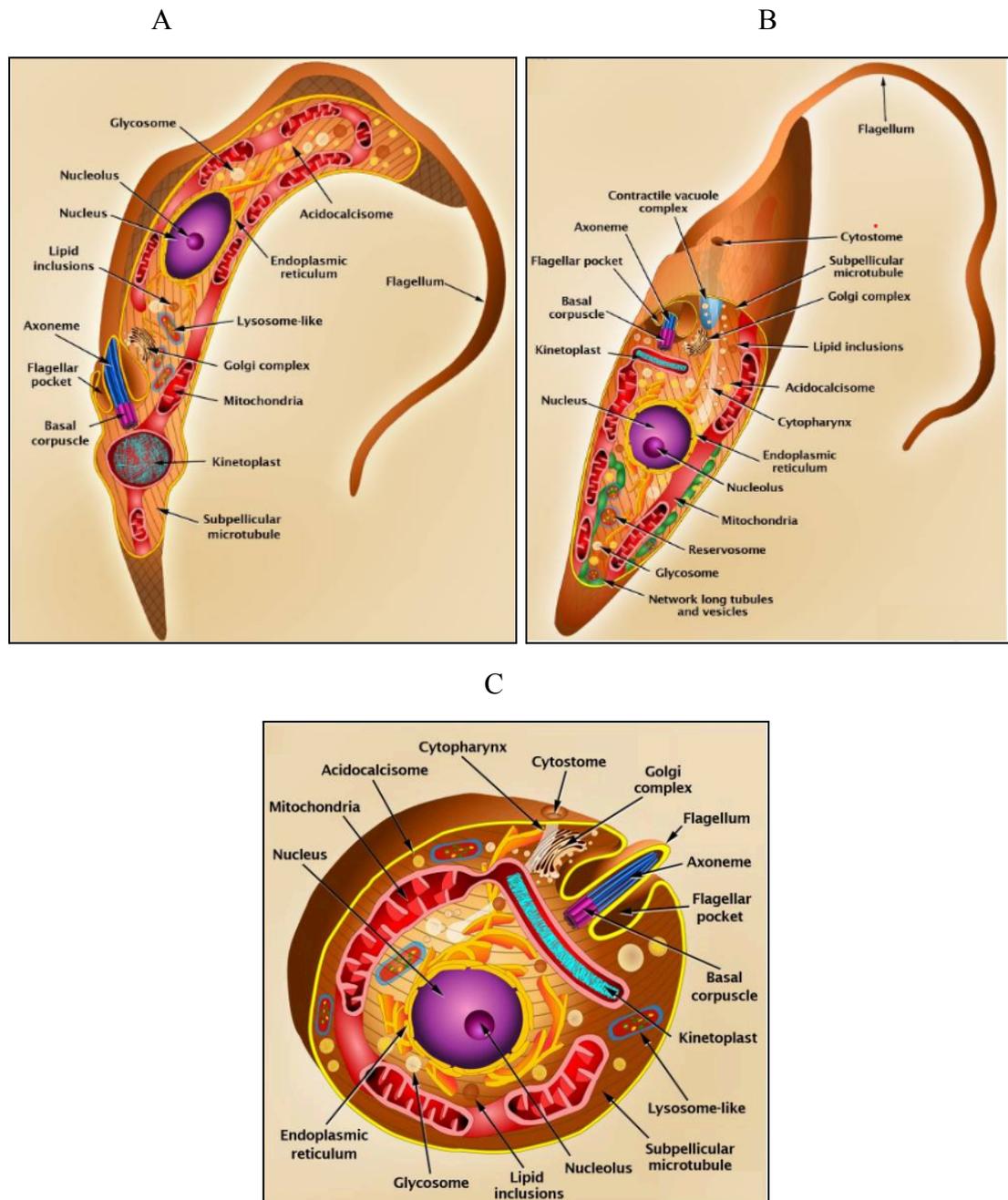
2.1.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário hemoflagelado que pertence à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. É o agente etiológico da DC e foi descoberto por Carlos Chagas, médico e pesquisador brasileiro, no ano de 1909. Sua morfologia é complexa e apresenta três principais formas evolutivas distintas: tripomastigota, amastigota e epimastigota (Figura 5), as quais se diferenciam com base na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e na emergência do flagelo (Chagas, 1909; Dias; Coura, 1997).

O cinetoplasto, um dos principais critérios de diferenciação das formas evolutivas de *T. cruzi*, é uma estrutura única que concentra o DNA mitocondrial e representa aproximadamente 20% do conteúdo genético total do parasito (Brenner, 1973). A estrutura flagelar é uma característica comum dos tripanossomatídeos. Seu comprimento varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, porém em nenhum momento se desprende da célula (Zuma; dos Santos Barrias; de Souza, 2021). Na constituição do citoplasma em suas diferentes formas encontra-se uma grande diversidade de organelas, entre elas o glicossomo, que concentra enzimas da via glicolítica, e os reservossomos, responsáveis pelo armazenamento de macromoléculas e enzimas lisossomais e a regulação de proteínas endógenas (Sant'Anna *et al.*, 2008; Zuma; dos Santos Barrias; de Souza, 2021). Sua membrana plasmática é composta por fosfolipídeos, glicoproteínas e glicolipídios (De Souza, 1984).

A forma tripomastigota é a forma infectante do parasito, sendo caracterizada por seu corpo alongado e membrana ondulante, podendo apresentar formas delgadas ou largas. Seu flagelo emerge da bolsa flagelar e seu cinetoplasto é arredondado com localização posterior ao núcleo. Pode ser encontrada na porção posterior do intestino e reto do inseto vetor na forma de tripomastigota metacíclica, e no sangue, linfa ou fluido intersticial dos hospedeiros vertebrados, sendo denominada tripomastigota sanguínea. Essa forma não possui capacidade de replicação, sendo possível obtê-las *in vitro* através de cultivo axênico, sob condições quimicamente definidas para a promoção da metaciclogênese (Zuma; dos Santos Barrias; de Souza, 2021).

Figura 5 - Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: A - Forma tripomastigota; B - Forma epimastigota; C - Forma amastigota.

Fonte: Teixeira e colaboradores (2021).

Já a forma amastigota é a forma replicativa no hospedeiro vertebrado, sendo capaz de se multiplicar dentro da célula infectada através de fissão binária. Ela apresenta morfologia arredondada e flagelo curto não exteriorizado, não visível através de microscópio óptico. Seu cinetoplasto encontra-se em forma de bastão ou barra. Predomina no interior de células do

hospedeiro infectado e também pode ser cultivada em meio axênico (Zuma; dos Santos Barrias; de Souza, 2021).

Por fim, a forma epimastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, apresenta cinetoplasto e bolsa flagelar posicionados anteriormente ao núcleo, com forma alongada e flagelo visível. Essa é a forma de replicação do parasito no vetor através da fissão binária, sendo ativa metabolicamente, além de ser a principal forma de cultivo *in vitro* (Carvalho, 2017; Zuma; dos Santos Barrias; de Souza, 2021). As formas epimastigotas são amplamente utilizadas em pesquisas devido à sua facilidade de cultivo em meios axênicos, permitindo estudos bioquímicos e fisiológicos. Meios monofásicos facilitaram estudos quantitativos ao possibilitar que essas formas cresçam livremente, sendo apropriados para o estudo do efeito de compostos sob o crescimento celular. O meio LIT (do inglês *liver infusion tryptose*) destaca-se como o mais utilizado atualmente (de Souza; Vidal, 2017).

2.1.2 Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* é heteroxênico e envolve dois hospedeiros distintos: um vertebrado, tipicamente o ser humano, e um invertebrado, os insetos triatomíneos, da subfamília Triatominae, pertencentes à ordem Hemiptera e à família Reduviidae. Nesse ciclo, o protozoário passa por transformações morfológicas e funcionais significativas para se adaptar aos diferentes ambientes de seus hospedeiros (de Sousa *et al.*, 2024; Rassi; Marin-Neto, 2010).

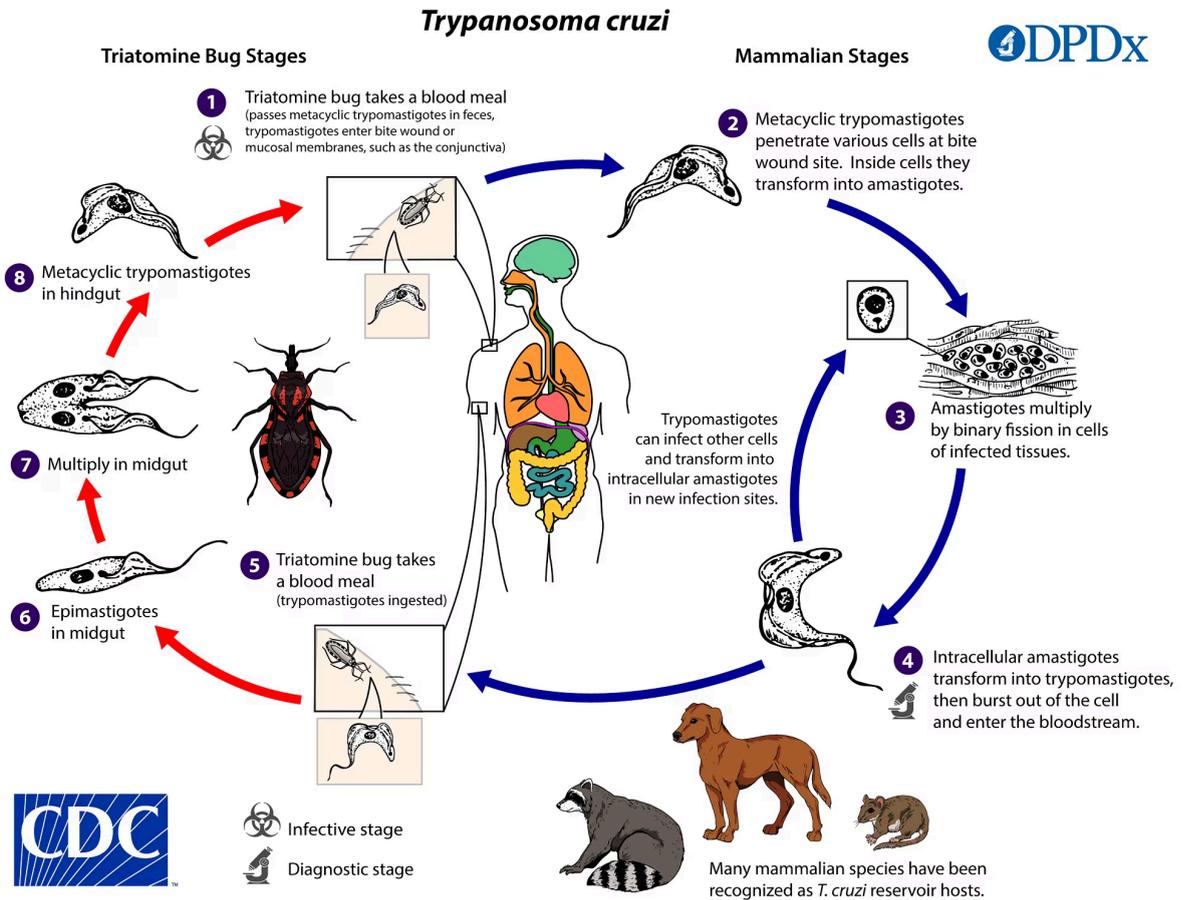
No hospedeiro invertebrado, a contaminação ocorre durante o repasto sanguíneo, quando o inseto vetor ingere sangue contendo formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* em hospedeiro vertebrado previamente infectado. Após a ingestão das formas, ainda no trato digestório do inseto, essas formas diferenciam-se em epimastigotas. Posteriormente, as epimastigotas migram para a porção posterior do intestino do inseto, onde, devido às condições de estresse nutricional e diminuição do pH, sofrem diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Azambuja; Garcia, 2017).

As formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nos dejetos do inseto durante ou após o repasto sanguíneo. Dessa forma ocorre a infecção no hospedeiro vertebrado, onde formas infectivas penetram através de lesões na pele ou por mucosas. Uma vez no interior das

células do hospedeiro, os parasitos diferenciam-se em amastigotas através de um processo chamado amastigogênese (Azambuja; Garcia, 2017; Ley *et al.*, 1988; Tomasina *et al.*, 2024).

As amastigotas são formas intracelulares replicativas que se multiplicam intensamente por divisão binária. Após diversas etapas de replicação, ainda dentro da célula, diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas. Devido ao movimento do flagelo, as formas tripomastigotas promovem a lise das células hospedeiras, sendo liberadas na corrente sanguínea para infectar novas células ou serem ingeridas por outro inseto vetor durante o repasto sanguíneo, completando o ciclo que está representado na figura 6 (Zuma; dos Santos Barrias; de Souza, 2021).

Figura 6 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: CDC (2021)

2.1.3 Formas de transmissão

A transmissão vetorial é a forma clássica de transmissão da doença aos seres humanos, e se dá através do contato com dejetos de triatomíneos contaminados com *T. cruzi*. Esses insetos são hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiros. A infecção ocorre quando os vetores se alimentam do sangue do hospedeiro e durante o repasto sanguíneo depositam seus dejetos contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, que são capazes de penetrar e infectar o hospedeiro através de mucosas ou de lesões pré-existentes (Fidalgo *et al.*, 2018).

As condições habitacionais, aliadas às práticas de saneamento, conservação e higiene adotadas pelos moradores, podem influenciar diretamente a infestação do ambiente por triatomíneos. Adicionalmente, fatores como mudanças climáticas, globalização e a persistência da pobreza têm contribuído para a alteração na distribuição geográfica desses vetores, permitindo sua ocupação em habitats anteriormente não habitados pelos mesmos (González-Salazar *et al.*, 2022; Tian; Durden; Hamer, 2024).

A transmissão através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos é considerada a segunda principal forma de transmissão da DC. O risco de contaminação está relacionado ao componente sanguíneo ou órgão doado e à carga parasitária do doador. Houve uma diminuição significativa nessa via de transmissão devido à triagem laboratorial de doadores, porém essa via continua sendo uma das principais formas de transmissão em países não endêmicos (Coura, 2014; Hochberg; Montgomery, 2023). Acidentes laboratoriais e contaminação através do manejo de animais infectados são consideradas formas raras de transmissão da doença (de Almeida, Ayssa Marinho Vitorino *et al.*, 2021).

Outra forma de transmissão é a transmissão vertical. Ela se dá a partir da transmissão da doença pela mãe ao filho durante a gestação ou no momento do parto, sendo que a alta carga parasitária materna é um dos principais fatores associados ao aumento do risco de transmissão por essa via (Klein *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, surtos recentes destacaram rotas de transmissão não vetoriais, com estudos epidemiológicos frequentemente associando a infecção à transmissão oral, principalmente relacionada ao consumo de produtos à base de frutas. Entre esses, o suco de açaí (*Euterpe oleracea*), feito de polpa batida, tem sido apontado como uma das principais

fontes suspeitas de infecção (Santana *et al.*, 2019). Consumo de caldo de cana é uma potencial fonte de transmissão no Brasil, com um registro de surto de transmissão oral no estado de Santa Catarina em 2005 (Brasil, 2015). Devido a quantidade de parasitos ingeridos, em surtos documentados de DC transmitida por alimentos, as infecções agudas sintomáticas apresentaram início mais rápido e evolução clínica mais grave. Os primeiros relatos de surtos relacionados à transmissão oral datam da década de 60 no Brasil, envolvendo 18 pessoas e 6 mortes. Um estudo retrospectivo verificou que dos 265 casos de DC aguda notificados no estado do Pará entre 2007 e 2017, 98,1% dos casos foram devido a transmissão oral (Coura, 2014; Da Silva *et al.*, 1968; Hochberg; Montgomery, 2023; Nery-Guimarães *et al.*, 1968; Sampaio *et al.*, 2020).

2.1.4 Formas Clínicas da Doença de Chagas

A DC apresenta duas fases distintas: aguda e crônica, que variam conforme a resposta do hospedeiro e o período de infecção. A fase aguda dura de 4 a 8 semanas, sendo marcada por elevada parasitemia e, em casos de transmissão vetorial, por sinais clínicos como o sinal de Romaña (edema palpebral unilateral) (Figura 1) ou chagoma de inoculação, associado ao local de entrada do parasito. Outros sintomas incluem febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, porém a maioria das infecções agudas são assintomáticas ou inespecíficas. Formas graves, embora raras, podem acometer de 1 a 5% dos pacientes, resultando em miocardite, encefalite ou complicações cardíacas severas. Em casos congênitos, a infecção geralmente é silenciosa, mas cerca de 10% a 40% dos recém-nascidos infectados podem apresentar baixo peso ao nascer, hepatomegalia e, ocasionalmente, manifestações graves, como hidropisia fetal. A mortalidade nessa fase está geralmente associada a infecções severas e à elevada carga parasitária (Coura, 2007; Hochberg; Montgomery, 2023; WHO, 2024b).

Figura 1 - Sinal de Romaña.



Nota: Criança apresentando edema palpebral unilateral. Fotografia de 1962, Panamá.

Fonte: Public Health Image Library (1962).

Após o final da fase aguda, caso não sejam tratados, a maioria dos pacientes evolui para a fase crônica indeterminada, caracterizada por baixa parasitemia e ausência de sintomas clínicos evidentes. Este estágio pode persistir por décadas, mas cerca de 30% a 40% dos pacientes eventualmente desenvolvem formas clínicas mais graves da doença. Essas incluem diferentes formas clínicas: cardíaca, digestiva, mista ou neurológica. A forma cardíaca é a principal causa de mortalidade, frequentemente associada à miocardite crônica progressiva, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. Já a forma digestiva pode evoluir para megaesôfago ou megacólon, manifestando-se como disfagia, constipação severa e regurgitação. Nas formas mistas as manifestações cardíacas e digestivas coexistem (Dias; Coura, 1997; Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006; WHO, 2024a).

As formas neurológicas são caracterizadas por alterações no sistema nervoso central, como a meningoencefalite. Essas manifestações são frequentemente associadas à destruição neuronal pelo parasita, principalmente em casos de imunossupressão. O diagnóstico tardio e a falta de tratamento adequado durante a fase indeterminada aumentam o risco de progressão para essas formas mais severas e debilitantes da doença. Embora a maioria das infecções crônicas permaneça assintomática ao longo da vida, a progressão para formas graves pode ser imprevisível e está relacionada a fatores como a carga parasitária inicial e a resposta

imunológica do hospedeiro (Dias; Coura, 1997; Pérez-Molina; Molina, 2018; Teixeira; Nascimento; Sturm, 2006; WHO, 2024a).

O manejo dos pacientes com DC é complexo e devido a baixa resposta ao tratamento etiológico, ele é majoritariamente realizado através do tratamento das comorbidades associadas. A forma cardíaca é a mais prevalente e que implica em maior impacto na qualidade de vida dos pacientes crônicos. A cardiomiopatia chagásica afeta em torno de 30% dos pacientes, levando a um quadro de miocardite difusa e progressiva, acarretando em morte súbita cardíaca causados por arritmia de 55 a 65% dos pacientes (Echavarría *et al.*, 2021). A prevalência da forma intestinal é de 12% no Brasil, e apesar de apresentar uma taxa de mortalidade inferior, também é responsável por impactos diretos na qualidade de vida dos pacientes, sendo tratada principalmente de forma paliativa (Baldoni *et al.*, 2024).

2.1.5 Epidemiologia

Estima-se que seis a oito milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* em todo o mundo, com uma estimativa de 12.000 mortes anuais devido à doença. A maior proporção de casos de DC encontra-se na América do Sul, com quatro a cinco milhões de infectados, principalmente no Brasil, Argentina, Bolívia e Venezuela. Essa região destaca-se pela diversidade de cepas de *T. cruzi*, vetores, hospedeiros mamíferos, como gambás, tatus, preguiças, tamanduás, roedores, morcegos e macacos, e manifestações clínicas. A incidência anual é de 30.000 novos casos na região (Cucunubá *et al.*, 2024; PAHO, 2023).

Embora as medidas de controle da transmissão vetorial intradomiciliar e transmissão transfusional tenham reduzido drasticamente a incidência da DC no Brasil, o país ainda é considerado um dos países endêmicos mais importantes na América Latina, com uma estimativa global de 3,7 milhões de portadores de DC crônica na população brasileira (Laporta *et al.*, 2024; Martins-Melo; Castro; Werneck, 2021). No período de janeiro de 2023 a janeiro de 2024 foram notificados 5.460 casos de DC crônica no país, sendo que a faixa etária mais acometida foi a de 50 a 69 anos, representando 51% dos casos (Brasil, 2024).

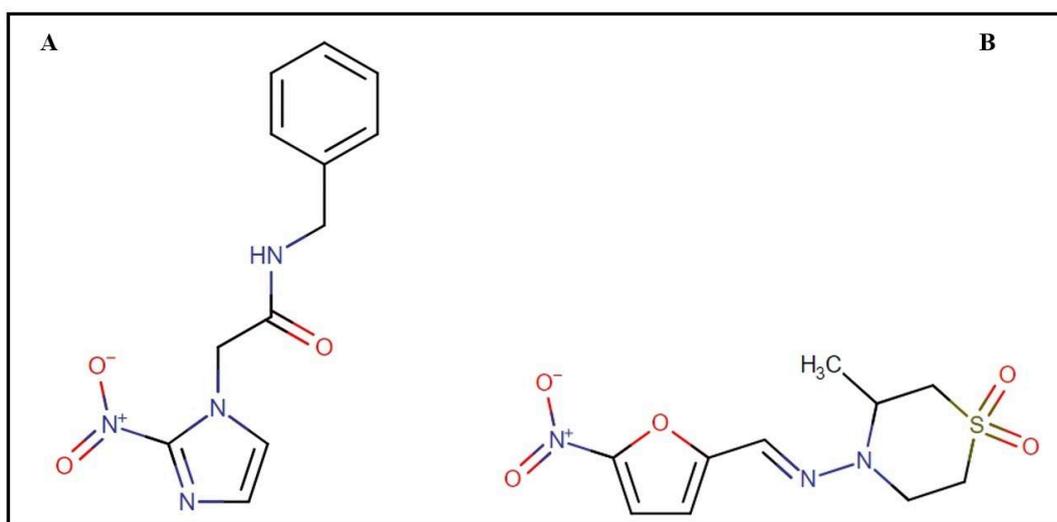
No estado de Mato Grosso do Sul já foram relatados casos autóctones de DC. (Borges-Pereira *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2018; Pompilio *et al.*, 2005). Nos anos de 2001 a 2023 foram notificados 33 casos de DC aguda no estado, segundo dados do sistema de

informação de agravos de notificação - SINAN (Ministério da Saúde, 2025). Dois estudos realizados no estado de Mato Grosso do Sul identificaram a presença de triatomíneos infectados por *T. cruzi*, com a principal ocorrência do parasito associada à espécie *Triatoma sordida* (Cominetti *et al.*, 2013, 2014).

2.1.6 Tratamento

Desde a descoberta da DC há mais de um século até os dias atuais, o tratamento etiológico da infecção é limitado a compostos nitro-heterocíclicos, sendo eles o benznidazol e o nifurtimox (Figura 2), fármacos desenvolvidos nos anos 70. O nifurtimox é um análogo do nitrofurano e o benznidazol um análogo nitroimidazólico, sendo ambos os fármacos denominados pró-fármacos (Pérez-Molina *et al.*, 2021; Urbina, 2002).

Figura 2 - Fórmula estrutural dos fármacos utilizados para tratamento da doença de Chagas.



Legenda: A) benznidazol e B) nifurtimox

Fonte: Drugbank, 2024

Esses compostos são ativados por uma nitrorredutase mitocondrial dependente de NADH do parasito, gerando radicais nitroaniônicos com ação tripanocida contra as formas tripomastigotas (forma infectante) e amastigotas (forma replicativa no hospedeiro infectado) de *T. cruzi*. O mecanismo de ação do benznidazol está relacionado à sua redução no interior das células do parasito, que resulta na geração do metabólito citotóxico glioxal. Este metabólito se liga covalentemente a guanosina, formando adutos que impedem a formação de novas cadeias de DNA, comprometendo a replicação e a sobrevivência do *T. cruzi*. Já o

nifurtimox, ao ser reduzido, gera um nitrilo de cadeia aberta não saturado. Esse composto é altamente reativo e pode interagir com diversos componentes celulares, exercendo um efeito tóxico direto sobre o parasito (Hall; Bot; Wilkinson, 2011; Hall Belinda S.; Wilkinson Shane R., 2012).

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, o benznidazol atinge seu pico de concentração plasmática em aproximadamente 3 horas após a ingestão, com meia vida de aproximada de 12 a 13 horas e biodisponibilidade de 91,7% (Raaflaub; Ziegler, 1979; Wiens *et al.*, 2016). O nifurtimox apresenta pico nos seus níveis plasmáticos após aproximadamente 3,5 horas. O fármaco sofre rápida biotransformação onde são observados diversos metabólitos não identificados com atividade tripanocida desconhecida, sendo que sua meia-vida de eliminação é de apenas 3 horas, sofrendo provável efeito de primeira passagem pré-sistêmico (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012).

O tratamento da DC varia de acordo com a fase clínica. Nas formas aguda e indeterminada, além de episódios de reativação após imunossupressão, o tratamento etiológico com benznidazol ou nifurtimox é indicado. Apesar de eficazes, especialmente na fase aguda, onde a cura parasitológica pode alcançar até 80%, os índices de sucesso na fase crônica são significativamente menores, com média de cura parasitológica em apenas 20% dos casos (Echeverria; Morillo, 2019; Urbina, 2010).

Ambos os fármacos apresentam efeitos colaterais importantes, representando um dos principais desafios no tratamento da DC e frequentemente levam a interrupção do tratamento. Os eventos adversos mais comuns associados ao benznidazol são dermatológicos, como erupções cutâneas leves a moderadas. Distúrbios gastrointestinais também são observados e são frequentemente os primeiros sinais de toxicidade. Alterações hematológicas e hepáticas leves também são relatadas, assim como manifestações neurológicas tardias. Os mecanismos como a formação de complexos moleculares reativos durante a metabolização do benznidazol e a interação desses produtos com componentes celulares do hospedeiro são apontados como causas subjacentes da toxicidade (Pérez-Molina *et al.*, 2021; Swett *et al.*, 2024).

Da mesma forma, o nifurtimox também apresenta toxicidade associada à formação de radicais livres durante sua metabolização hepática. Ele apresenta alta incidência de reações adversas (80%–100%) e interrupção do tratamento (18%–44%). Os efeitos adversos mais

comuns são gastrointestinais, sintomas neurológicos, distúrbios digestivos, hipersensibilidade cutânea e febre, sendo que a frequência e a gravidade variam conforme o contexto geográfico (Pérez-Molina *et al.*, 2021; Swett *et al.*, 2024).

Entre os dois, o benznidazol é o mais amplamente utilizado devido à menor taxa de toxicidade relativa quando comparado com o nifurtimox e é considerado o fármaco de referência para tratamento da DC no Brasil, fazendo parte do Componente Estratégico da Assistência Farmacêutica da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (Brasil, 2022).

2.2 Novos candidatos quimioterápicos para o tratamento da Doença de Chagas

A busca pela descoberta de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas é um processo contínuo, com diversos compostos sendo testados anualmente na tentativa de identificação de um candidato promissor. Estratégias de triagem de alto rendimento são aplicadas para a descoberta de novas séries de compostos com potencial terapêutico. O DNDi tem desempenhado um papel central nesse esforço, desenvolvendo portfólios de compostos naturais e sintéticos, com iniciativas como o *Chagas Hit-to-lead* e parcerias com universidades e indústrias farmacêuticas para a triagem de novos compostos (DNDI, 2025). Paralelamente, diversos ensaios clínicos têm sido registrados para avaliar a eficácia da atividade tripanocida de compostos como posaconazol, selênio, ácido acetilsalicílico, fexinidazol, colchicina e amiodarona (Mansoldo *et al.*, 2020).

Na intenção de padronizar as linhagens de *T. cruzi*, o parasito foi classificado em sete diferentes tipos de DTUs (do inglês *discrete typing units* ou em português unidades discretas de tipagem), sendo elas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e Tcbat. Estudos demonstram associações de determinadas linhagens à distribuição geográfica e epidemiológica da doença, além de diferenças na susceptibilidade aos fármacos benznidazol e nifurtimox. Dessa forma, as diferenças entre as cepas é um aspecto importante a ser considerado na busca de novos candidatos quimioterápicos para o tratamento da DC (de Sousa *et al.*, 2024; Zingales *et al.*, 2009, 2014).

Outro aspecto relevante a ser considerado no âmbito da busca de novos fármacos para a DC são os alvos das drogas a serem selecionadas. Por fazerem parte de grande parcela da funcionalidade da célula e desempenharem um papel essencial na adaptação do parasito aos

diferentes ambientes que encontra ao longo de seu ciclo de vida, os metabolismos energético e lipídico de *T. cruzi* apresentam um grande potencial como alvo para o tratamento. Embora avanços significativos tenham sido feitos na compreensão dessas vias, ainda existem lacunas importantes, especialmente sobre como o metabolismo lipídico e energético do parasito é regulado *in vivo* e como essas adaptações podem ser exploradas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a DC (Booth; Smith, 2020; Liu; Ulrich vonBargen; McCall, 2021; Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

2.2.1 Metabolismo Lipídico

Os lipídios desempenham papéis fundamentais na biologia celular, sendo o principal componente estrutural de membranas celulares. Atuam também como moléculas sinalizadoras e são utilizados como fonte de energia. Em tripanossomatídeos, os lipídios são importantes não apenas como recursos energéticos e estruturais, mas também como fatores de patogenicidade, ajudando o parasito a evadir de respostas imunológicas, manipulando processos do hospedeiro e promovendo a infecção, sendo essenciais para sua sobrevivência e replicação (de Aquino *et al.*, 2021; Ramakrishnan *et al.*, 2013).

A composição dos lipídios em *T. cruzi* é variável de acordo com as diferentes formas evolutivas. Os fosfolipídios representam de 60 a 70% dos lipídios constituintes da membrana plasmática das formas tripomastigotas e amastigotas, com predominância da fosfatidilcolina. Os triacilglicerídeos são os segundos mais abundantes, representando 25% dos lipídeos nas formas amastigotas, estando em menor proporção nas demais formas, enquanto cerca de 10% dos lipídeos de *T. cruzi* são esfingolipídeos (Booth; Smith, 2020).

O parasito não possui a capacidade de sintetizar colesterol, sintetizando apenas o ergosterol. Nas formas epimastigotas, *T. cruzi* sequestra colesterol do hospedeiro, armazenando-o em forma de ésteres de colesterol em inclusões lipídicas conhecidas como reservossomos. Estes ésteres são utilizados como fonte de energia durante sua diferenciação. Em condições de privação de lipídios exógenos, o colesterol livre dos reservossomos é consumido, o que é compensado pelo aumento da biossíntese de ergosterol, destacando o papel crucial do metabolismo lipídico no desenvolvimento do parasita. Avanços em análises genômicas revelaram particularidades na via de biossíntese de esteróis em *T. cruzi*, tornando-a um alvo promissor para o desenvolvimento de quimioterápicos (Biagiotti *et al.*, 2017; Booth; Smith, 2020; Roberts *et al.*, 2003).

2.2.2 Metabolismo Energético

Os tripanossomatídeos possuem um metabolismo energético complexo e adaptável, que difere não apenas entre as diferentes espécies, mas também entre os estágios do ciclo de vida de uma mesma espécie. *Trypanosoma cruzi* depende diretamente das fontes de carbono existentes em seus hospedeiros para seu metabolismo energético. Devido às grandes diferenças na composição dos ambientes onde o parasito se encontra dependendo do seu hospedeiro, suas formas evolutivas se adaptaram para a utilização de diferentes fontes de energia. Enquanto as formas amastigotas e tripomastigotas presentes no hospedeiro vertebrado utilizam a glicose como fonte energética, as formas epimastigotas presentes no inseto vetor utilizam aminoácidos como a L-prolina e L-glutamina em seu metabolismo energético (Bringaud; Rivière; Coustou, 2006).

Uma característica dos cinetoplastídeos é a compartimentalização da maior parte das enzimas glicolíticas nos glicossomos, organelas similares aos peroxissomos. Essas estruturas contêm enzimas da via glicolítica e de gliconeogênese, e são encontradas distribuídas por todo corpo celular, com até 50 unidades dispostas pelo citosol em *T. cruzi* (Michels *et al.*, 2021; Quiñones *et al.*, 2020).

Um dos principais produtos do metabolismo energético é a adenosina trifosfato (ATP). Essa molécula está envolvida em diversas reações essenciais para a viabilidade celular, incluindo o funcionamento da bomba de prótons H⁺-ATPase. Essas bombas são um importante mecanismo para a manutenção da homeostase de pH em *T. cruzi* (Vanderheyden; Benaim; Docampo, 1996). Assim como em fungos, as bombas de prótons H⁺-ATPase de *T. cruzi* funcionam como transportadores primários, bombeando prótons para fora da célula e criando gradientes de pH e potenciais elétricos, os quais impulsionam o transporte secundário de íons e metabólitos, essenciais para o metabolismo e a sobrevivência do parasita (Vieira *et al.*, 2005).

As particularidades e processos envolvidos nessa via metabólica, reforçam o interesse em explorar as enzimas e estruturas associadas, em busca de alvos para o desenvolvimento de novas terapias contra a DC (Michels *et al.*, 2021; Opperdoes; Michels, 2001).

2.3 Reposicionamento de Fármacos

O tratamento da DC enfrenta desafios significativos, com um cenário marcado pela ausência de novas opções terapêuticas desde o desenvolvimento dos fármacos benznidazol e nifurtimox. Esses medicamentos apresentam limitações importantes, incluindo alta toxicidade e efeitos adversos que afetam cerca de 40% dos pacientes. Além disso, as taxas de cura na fase crônica da doença permanecem insatisfatórias, refletindo a necessidade urgente de avanços terapêuticos (WHO, 2024a).

Embora existam esforços na descoberta de novos fármacos, o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo complexo e oneroso, que requer altos investimentos e longos períodos para a realização de ensaios clínicos. Há pouco envolvimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos voltados para DTNs, como a DC, devido a previsão de baixo retorno financeiro, o que resulta em insuficientes esforços nesse âmbito (da Silva *et al.*, 2021).

Diante desse panorama, o reposicionamento de fármacos tem se destacado como uma abordagem promissora. Essa estratégia, que consiste em identificar novos usos para medicamentos já existentes, oferece a vantagem de reduzir custos e tempo de desenvolvimento, uma vez que os perfis de segurança e disponibilidade desses fármacos já estão estabelecidos. Atualmente, o reposicionamento de fármacos tem sido amplamente explorado como uma alternativa viável e eficiente para acelerar a descoberta de tratamentos mais seguros e eficazes para a DC, assim como outras DTNs (Andrews; Fisher; Skinner-Adams, 2014; Ashburn; Thor, 2004; da Silva *et al.*, 2021).

O reposicionamento de fármacos baseia-se em avanços na biologia molecular, no entendimento do genoma humano e no conceito de fármacos pleiotrópicos, que possuem múltiplos efeitos biológicos e interagem com diversos alvos. A partir do mapeamento do perfil molecular das doenças – incluindo genes, biomarcadores e vias de sinalização – e do uso de métodos computacionais (*in silico*), é possível identificar semelhanças entre doenças que compartilham alvos biológicos. Isso sugere que um mesmo fármaco pode ser eficaz contra condições diferentes. Além disso, métodos experimentais biológicos, combinados com abordagens *in silico* e o acesso a bases de dados abertas, têm acelerado e tornado mais eficiente o reposicionamento, reduzindo custos. Assim, essa estratégia viabiliza a descoberta

de novas aplicações para medicamentos já existentes, aproveitando conhecimentos prévios sobre segurança e disponibilidade desses compostos (Jourdan *et al.*, 2020; Kale *et al.*, 2022).

Um exemplo clássico de reposicionamento de fármaco bem sucedido é o ácido acetilsalicílico, originalmente comercializado desde 1899 como analgésico, com reposicionamento em 1980 com nova indicação como antiagregante plaquetário. A talidomida, fármaco que se tornou bastante conhecido devido ao seu efeito teratogênico, também passou pelo processo de reposicionamento. Sua indicação inicial era o tratamento de enjoo matinal, porém 10 anos após sua descoberta estudos demonstraram seu potencial no tratamento de eritema nodoso hansênico. Em 2006 a talidomida passou por novo estudo de reposicionamento, sendo então indicada no tratamento de mieloma múltiplo (Jourdan *et al.*, 2020).

O reposicionamento de fármacos também vem sendo aplicado na busca de tratamento das doenças causadas por protozoários, como a malária, a toxoplasmose e a leishmaniose (Andrews; Fisher; Skinner-Adams, 2014). Em estudo associando ferramentas *in silico* e *in vitro*, Gupta e colaboradores (2022) investigaram o reposicionamento dos fármacos lansoprazol e posaconazol no tratamento da leishmaniose, verificando ação desses fármacos em alvos de proteínas específicas de *Leishmania donovani*.

Uma ampla gama de classes terapêuticas vêm sendo exploradas para o reposicionamento de fármacos na DC, incluindo antineoplásicos, antihistamínicos, estatinas, fibratos, antifúngicos, antimicrobianos, antivirais, antiparasitários, além de medicamentos que atuam no sistema nervoso central e cardiovascular. Outra abordagem crescente é o uso de terapia medicamentosa combinada, que envolve a administração de diferentes medicamentos com modos de ação complementares. Essa estratégia não apenas potencializa a eficácia terapêutica, mas também ajuda a mitigar os desafios relacionados à toxicidade. A maioria das combinações relatadas utiliza benzonidazol ou nifurtimox, embora outras combinações envolvendo medicamentos reposicionados também estejam sendo exploradas (Bellera *et al.*, 2020; Porta; Kalesh; Steel, 2023).

2.3.1 Análises *in silico*

Dentro do reposicionamento de fármacos, as análises *in silico* têm se destacado como um instrumento poderoso para a descoberta de novos alvos terapêuticos. O termo *in silico* refere-se aos métodos de experimentação que complementam as abordagens *in vivo* e *in vitro*

no contexto da pesquisa, sendo usado para indicar o uso de ferramentas computacionais (Pappalardo *et al.*, 2019).

A metodologia *in silico* envolve a utilização de softwares avançados e bases de dados para simular cenários biológicos e químicos. Essa abordagem é amplamente utilizada em estudos pré-clínicos para avaliar toxicidade, atividade farmacológica e mecanismos de ação de medicamentos. No caso da DC é possível utilizar bancos de dados genômicos *online* de acesso livre como o *TDR Targets*, focado em patógenos de doenças negligenciadas, e o *TriTrypDB* que oferece informações detalhadas sobre tripanossomatídeos. Na busca de fármacos e seus alvos, repositórios como *DrugBank* e o *Therapeutic Targets Database* (TTD) auxiliam no reposicionamento de medicamentos ao fornecer dados sobre moléculas previamente aprovadas e suas interações com alvos terapêuticos. Essa combinação de dados genômicos e químicos permite uma abordagem integrada para identificar novos tratamentos (Aslett *et al.*, 2010; Magariños *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020; Wishart *et al.*, 2008).

Recentemente o Grupo de Pesquisa de Ensaios Biológicos com *T. cruzi* (*GTcruzi*) tem utilizado estratégias baseadas em dados genômicos de *T. cruzi* para selecionar fármacos com atividade tripanocida. Análises *in silico* identificaram os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol como candidatos promissores devido à sua ação em enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico e energético do parasito, como a lanosterol-sintase e a H⁺-ATPase do tipo P. Ensaios *in vitro* confirmaram sua atividade biológica, destacando o potencial dessas ferramentas para acelerar a descoberta de novos tratamentos e otimizar o reposicionamento de medicamentos existentes (Garcia, 2022).

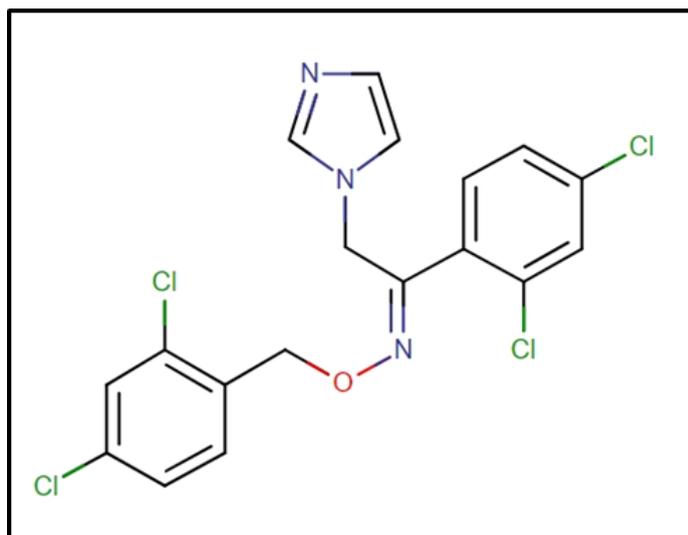
2.3.2 Nitrato de Oxiconazol

O nitrato de oxiconazol (Figura 3) é um agente antifúngico tópico. Faz parte da classe dos antifúngicos imidazólicos tópicos, juntamente com o clotrimazol, miconazol, econazol, butoconazol, sertaconazol e sulconazol, sendo utilizado no tratamento tópico de infecções causadas por dermatófitos patogênicos no estrato córneo e mucosas escamosas. Está disponível na forma de loção e creme a 1% (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012; Golan *et al.*, 2009).

Assim como os demais azóis da sua classe, o nitrato de oxiconazol inibe a biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima do citocromo P450 14 α -esterol desmetilase

(CYP51), promovendo um acúmulo de 14 α -metil esteróis e a quebra das cadeias acil dos fosfolipídios na membrana dos fungos. O ergosterol é o componente primário na composição da membrana plasmática dos fungos, de forma que a inibição da sua síntese promove a lise celular (Drugbank, 2024b; Golan *et al.*, 2009; Vishwakarma; Haider; Soni, 2024).

Figura 3 - Estrutura química do nitrato de oxiconazol.



Fonte: Drugbank (2024a).

Em *T. cruzi* o ergosterol é essencial para a estabilização das membranas, regulação de permeabilidade e fluidez, além da modulação de enzimas e canais iônicos ligados à membrana, sendo indispensável para seu crescimento, desenvolvimento e divisão. Diferentemente dos mamíferos, o parasito não consegue acumular ergosterol, tornando letal a interrupção de sua biossíntese. Nesse contexto, inibidores da enzima CYP51, têm sido amplamente explorados no tratamento da DC devido às semelhanças na via biossintética de esteróis entre fungos e tripanossomatídeos (Beltran-Hortelano *et al.*, 2020, 2022).

Os primeiros relatos da atividade de inibidores da 14 α -esterol desmetilase em *T. cruzi* são da década de 1980 (Docampo *et al.*, 1981), e desde então diversos estudos vêm sendo realizados com diversos azóis como cetoconazol, posaconazol e fluconazol (Buckner; Urbina, 2012; Choi; Podust; Roush, 2014). Um aspecto importante a ser destacado é que os inibidores de CYP51 investigados demonstraram especificidade para as enzimas dos fungos e parasitos, sem afetar a CYP51 humana, que desempenha um papel essencial na biossíntese de colesterol (Lepesheva; Friggeri; Waterman, 2018).

2.3.3 Lansoprazol

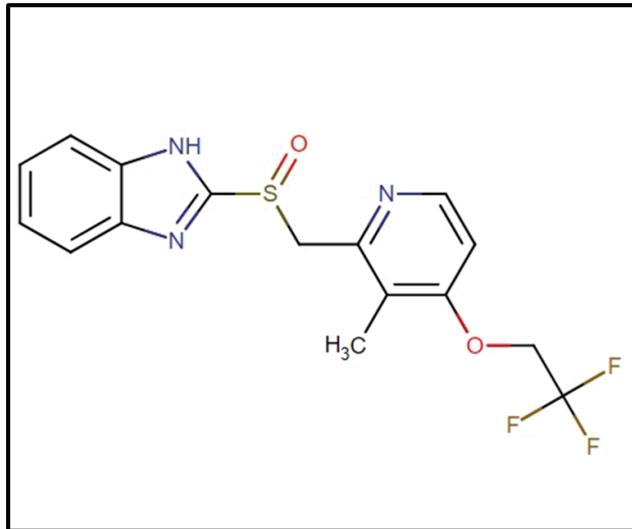
O lansoprazol é um inibidor da bomba de prótons (IBP) (Figura 4) utilizado no tratamento de condições relacionadas à hipersecreção gástrica, como úlcera péptica, esofagite de refluxo, infecção por *Helicobacter pylori* e síndrome de Zollinger-Ellison. Seu mecanismo de ação é o bloqueio irreversível da H⁺/K⁺-ATPase (EC: 7.2.2.19), também conhecida como bomba de prótons, que desempenha um papel crucial na secreção ácida do estômago. Além do lansoprazol, outros medicamentos dessa classe incluem omeprazol, rabeprazol, esomeprazol, dexlansoprazol e pantoprazol (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012; Rang *et al.*, 2015).

Os IBPs são pró-fármacos que requerem ativação em ambientes ácidos. Após serem absorvidos na circulação sistêmica, eles se acumulam nos canalículos secretores ácidos das células parietais gástricas, onde são ativados por meio de uma reação catalisada por prótons formando uma sulfenamida tetracíclica. A forma ativada do fármaco liga-se covalentemente aos grupos sulfidríla das cisteínas na H⁺/K⁺-ATPase, inativando irreversivelmente a bomba de prótons e reduzindo a secreção de ácido gástrico (Brunton; Chabner; Knollmann, 2012; Golan *et al.*, 2009; Shin; Kim, 2013).

No aspecto farmacocinético, o lansoprazol atinge seu pico de concentração plasmática em 1,7 horas após administração oral, com biodisponibilidade de 80-90%. Sua meia-vida é de aproximadamente 2 horas, porém é capaz de inibir a secreção gástrica por até 24 horas devido ao seu mecanismo de ação (Drugbank, 2024a).

No âmbito dos tripanossomatídeos, o lansoprazol demonstrou eficácia na inibição do desenvolvimento de *Leishmania spp. in vitro*, atuando sobre ATPases de transporte de cálcio na membrana do retículo endoplasmático de *Leishmania donovani*, essenciais para a sobrevivência do parasito (Gupta *et al.*, 2022). Contudo, não há relatos na literatura sobre estudos envolvendo a interação desse fármaco com o modelo biológico de *T. cruzi*. Por outro lado, García-Torres (2023) investigou o reposicionamento do rabeprazol, outro IBP, como fármaco anti-*T. cruzi*, demonstrando uma eficácia 14,5 vezes superior ao benznidazol. O estudo revelou aumento nos níveis de metilglioxal e produtos finais de glicação avançada após a inibição da triose-fosfato isomerase celular pelo rabeprazol, sugerindo que a inativação desta enzima ocorre pela derivatização de três dos seus quatro resíduos de cisteína.

Figura 4 - Estrutura química do lansoprazol.



Fonte: Drugbank (2024b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial atividade de fármacos combinados sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o Índice de Combinação (IC) das combinações;

Determinar o Índice de Redução de Doses (IDR) das combinações;

Avaliar a citotoxicidade dos fármacos, isoladamente e combinados, sobre células animais;

Determinar o Índice de Seletividade (IS) das combinações propostas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características do Estudo

Pesquisa experimental, desenvolvida com ensaios *in vitro* utilizando como modelo experimental uma população clonal do protozoário *Trypanosoma cruzi* da cepa Dm28c (Contreras *et al.*, 1985). O material experimental utilizado neste projeto está cadastrado no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o número A64768A e não se enquadra na Lei 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético.

4.2 Fármacos selecionados para o estudo

Com base nos resultados obtidos recentemente em trabalho realizado no Laboratório pelo *GT cruzi*, foram selecionados fármacos com potencial atividade sobre *T. cruzi*. Nesse estudo, através do método de análises *in silico* utilizando bases de dados *online* e gratuitas foi realizada a busca e seleção de drogas com potencial ação sobre enzimas homólogas dos metabolismos energético e lipídico do parasito, com base na identificação de alvos de drogas com alta similaridade aos genes de patógenos. Foram selecionados fármacos cuja atividade anti-*T.cruzi* Dm28c não havia sido reportada na literatura. De um total de sete fármacos testados *in vitro* frente às formas epimastigotas de *T.cruzi* Dm28c, o Nitrato de Oxiconazol e o Lansoprazol apresentaram os melhores resultados (Garcia, 2022) e portanto foram selecionados para a utilização neste estudo.

4.3 Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Os testes foram realizados com as formas epimastigotas de *T. cruzi*, pertencentes à cepa Dm28c, originalmente isolada de *Didelphis marsupialis* (Contreras *et al.*, 1985), um marsupial selvagem. A cada três dias o repique da cultura foi realizado para manter o crescimento exponencial dos parasitos. Os parasitos foram mantidos em meio LIT suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) em uma temperatura constante de 28 °C em incubadora com demanda de oxigênio.

4.4 Ensaio de viabilidade com MTS

O ensaio do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)

-2H-tetrazólio) foi realizado com os fármacos previamente selecionados nas análises *in silico* com o objetivo de avaliar o efeito dos mesmos sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Células em fase exponencial foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 1×10^6 parasitas/mL em placas de 96 poços. Estas células foram incubadas em 28 °C por 72h na presença de seis concentrações de cada fármaco selecionado baseando-se no CI_{50} dos fármacos não combinados (150; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 ug/mL). Após incubação inicial, foram adicionados em cada poço 20 μ L da solução de MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)/metossulfato de fenazina), sendo as placas em seguida incubadas por 4h. Após este procedimento a densidade óptica (absorbância) foi medida a 450 nm em leitor de microplaca. Os ensaios foram realizados utilizando o DMSO (Dimetilsulfóxido) como controle negativo e o fármaco de referência benznidazol como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 Ensaio de Combinação

O ensaio de combinação foi realizado utilizando diferentes concentrações de cada fármaco em combinação. As proporções de fármacos utilizadas em cada ensaio foram: 0:4; 1:3; 1:1; 3:1 e 4:0 (FÁRMACO 1: FÁRMACO 2) de acordo com a metodologia de Almeida (2021). Cada fármaco isolado foi diluído em DMSO (Dimetilsulfóxido) 100% e, depois, em PBS 1X (*Phosphate Buffer Saline*), para obtenção das concentrações finais a serem combinadas e testadas contra os parasitos. Para tanto, foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento, incubadas em meio LIT em densidade celular final de 10^7 parasitas/mL, em uma placa de 96 poços. Cada ponto da combinação foi realizado em triplicata.

A viabilidade celular dos parasitos após a incubação por 72h com os compostos em combinação foi feita a partir do método colorimétrico utilizando MTS associado ao acoplador de elétrons PMS (Henriques *et al.*, 2011). Para tanto, foram utilizados 20 μ L de reagente em todos os poços e 10 μ L de Paraformaldeído (PF) 1% nos poços designados para obtenção do controle de crescimento basal.

Após 4h de incubação em 28 °C, a densidade óptica (DO) foi medida em um leitor μ Quant. A determinação dos valores de concentração inibitória foi realizada por meio da curva de regressão não linear, no software *GraphPad Prism 7.04* (GraphPad software ®).

4.6 Determinação do Índice de Combinação (IC) e Índice de Redução de Dose (IRD)

O índice de combinação foi calculado pela razão entre a concentração de cada fármaco na combinação e em tratamento isolado. A partir dos valores de CI_{25-90} , obtidos no ensaio do MTS, foram calculadas as concentrações de cada fármaco utilizadas em cada associação. Para tanto, cada valor de IC foi multiplicado pelo número de partes correspondente a um dos compostos nas proporções 0:4; 3:1, 1:1; 1:3 ou 4:0 e dividido pelo número total de partes da combinação ($P = 4$).

$$[] \text{ composto na combinação} = \frac{CI_{25,50,75 \text{ ou } 90} \cdot ([] \text{ composto isolado} \div n^{\circ} \text{ de partes})}{[] \text{ composto isolado}}$$

$$IC = \frac{[] \text{ composto na combinação}}{[] \text{ composto isolado}}$$

A partir desses dados foi realizada a média dos valores de CI (Concentração Inibitória) obtidos para cada combinação, afim de obter a classificação segundo Chou (2006), em: 0,1-0,3 (forte sinergismo); 0,3-0,7 (sinergismo); 0,7-0,85 (sinergismo moderado); 0,9-1,1 (quase aditivo); 1,1 – 1,2 (leve antagonismo); 1,2 – 1,45 (antagonismo moderado); 1,45 – 3,3 (antagonismo). Após as análises estatísticas, os dados foram compilados em um isoblograma, que é a representação gráfica das concentrações isoladas e em associação que causam 25%, 50%, 75% ou 90% de efeito de dois fármacos.

O isoblograma, o índice de combinação (IC) e o índice de redução de doses (IRD ou do inglês *Dose Reduction Index* - DRI) foram calculados no *software* Excel®, segundo Chou (2010).

4.7 Citotoxicidade em células animais e índice de seletividade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células Vero (ATCC® : CCL-81™) com 70% de confluência do tapete celular em concentração igual a $2,10^5$ células/mL. As células foram semeadas em placas de 96 poços ($2,10^4$ células/poço) em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10% de SBF e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24 horas as células foram incubadas com a combinação dos fármacos diluídos em DMSO 100% e, posteriormente, em meio DMEM para obtenção das concentrações a serem testadas frente às células animais.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT 3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Após 24 horas, as células foram lavadas e adicionados 50 µL de MTT (2 mg/mL) diluído em meio DMEM. Após 4h de incubação, 50 µL de DMSO 100% foram adicionados e a densidade óptica foi lida a 490 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas. O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre os valores da CC_{50} obtidos e os valores de CI_{50} dos fármacos isolados e em combinação frente aos parasitos. A determinação dos valores de $CI_{50}/24h$ e $CC_{50}/24h$ foi realizada por meio da curva de regressão não linear pelo software *GraphPad Prism 7.04* (*GraphPad software* ®). A comparação entre as concentrações inibitórias obtidas no ensaio de associação e a comparação entre as concentrações citotóxicas foi realizada por meio do teste de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$).

O índice de seletividade (IS) das combinações testadas foi obtido pela razão entre o valor de CC_{50} do teste de citotoxicidade em células animais e seu respectivo valor de CI_{50} do ensaio de MTS em cada combinação para a avaliação da seletividade dos fármacos combinados para o seu alvo sem causar toxicidade às células do hospedeiro.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da combinação dos fármacos

No ensaio de MTS após 72 horas de exposição, os fármacos benznidazol e nitrato de oxiconazol apresentaram diminuição na viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 1). O fármaco lansoprazol não apresentou atividade *in vitro* anti-*T. cruzi*.

Tabela 1- CI_{50} dos fármacos não combinados testados *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* após 72 horas de exposição.

Fármacos	CI_{50}	R^2	Intervalo de Confiança
Nitrato de Oxiconazol	91,1 μ M	0,79	62,5 – 132,8 μ M
Lansoprazol	NA	NA	NA
Benznidazol	23,5 μ M	0,99	15,8 – 20,6 μ M

Legenda: CI_{50} - Concentração Inibitória para 50% dos parasitos testados; R^2 - Coeficiente de determinação; NA - Não Ativo.

A combinação de nitrato de oxiconazol:lansoprazol foi ativa contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando diminuição da CI_{50} em relação ao nitrato de oxiconazol não combinado em todas as proporções testadas, com a proporção 1:3 sendo considerada a mais ativa (CI_{50} : 15,1 μ M). A combinação de benznidazol:nitrato de oxiconazol também apresentou atividade, sendo que a combinação com menor $CI_{50,25,75}$ e CI_{90} foi na proporção 3:1 (CI_{50} : 7,10 μ M). Os resultados de $CI_{50,25,75}$ e CI_{90} estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2- CI_{50} , CI_{25} , CI_{75} e CI_{90} dos fármacos combinados testados *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* após 72 horas de exposição.

Combinação	Proporção	CI_{50}	R^2	Intervalo de Confiança (CI_{50})	CI_{25}	CI_{75}	CI_{90}
Nitrato de Oxiconazol: Lansoprazol	1:3	15,1 μ M	0,86	8,6 – 26,3 μ M	11,3 μ M	20,0 μ M	26,6 μ M
	1:1	49,6 μ M	0,90	41,9 – 58,5 μ M	41,5 μ M	59,2 μ M	70,4 μ M
	3:1	~45,7 μ M	0,94	-	~43,5 μ M	48,7 μ M	52,2 μ M
Benznidazol: Nitrato de Oxiconazol	1:3	52,2 μ M	0,94	30,9 – 39,3 μ M	21,6 μ M	125,9 μ M	303,9 μ M
	1:1	19,7 μ M	0,77	14,4 – 22,8 μ M	15,2 μ M	25,6 μ M	33,1 μ M
	3:1	7,1 μ M	0,89	5,2 – 8,3 μ M	4,9 μ M	10,3 μ M	15,0 μ M

Legenda: CI_{50} - Concentração Inibitória para 50% dos parasitos testados; CI_{25} - Concentração Inibitória para 25% dos parasitos testados; CI_{75} - Concentração Inibitória para 75% dos parasitos testados; CI_{90} - Concentração

Inibitória para 90% dos parasitos testados; R2 - Coeficiente de determinação da CI_{50} ; NA - Não Ativo; (-): intervalo de confiança muito amplo.

5.2 Índice de combinação

A combinação entre nitrato de oxiconazol e lansoprazol teve um efeito sinérgico ($IC < 1$) em todas as proporções testadas. Nas combinações dos compostos benznidazol e nitrato de oxiconazol, a maior parte das proporções também apresentaram efeito de sinergismo, com IC inferior a 1. Verificou-se que a proporção de 1:3 apresentou efeito de antagonismo com IC superior a 1,1 nas CI_{50} , CI_{75} e CI_{95} conforme demonstrado na tabela 3.

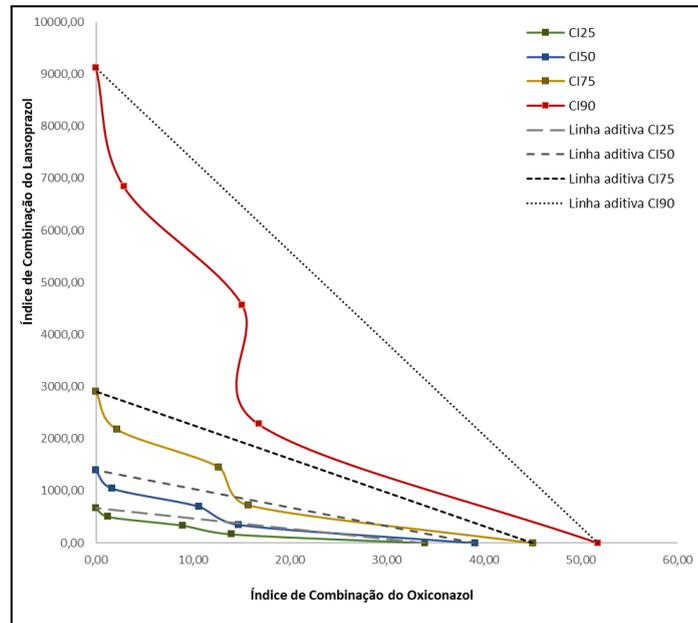
Tabela 3 - Valores dos índices de combinação, classificados segundo Chou (2006), sobre epimastigotas de *T. cruzi*.

Combinação	Proporção	CI_{25}	CI_{50}	CI_{75}	CI_{95}
Nitrato de Oxiconazol: Lansoprazol	1:3	0,79 ⁺	0,79 ⁺	0,80 ⁺	0,81 ⁺
	1:1	0,76 ⁺	0,77 ⁺	0,78 ⁺	0,80 ⁺
	3:1	0,66 ⁺⁺	0,63 ⁺⁺	0,60 ⁺⁺	0,57 ⁺⁺
Benznidazol: Nitrato de Oxiconazol	1:3	1,07 [±]	1,78 ⁻	2,96 ⁻	4,93 ⁻
	1:1	0,63 ⁺⁺	0,65 ⁺⁺	0,69 ⁺⁺	0,76 ⁺
	3:1	0,33 ⁺⁺	0,42 ⁺⁺	0,36 ⁺⁺	0,70 ⁺⁺

Legenda: (++) sinergismo; (+) sinergismo moderado; (±) quase aditivo; (-) antagonismo.

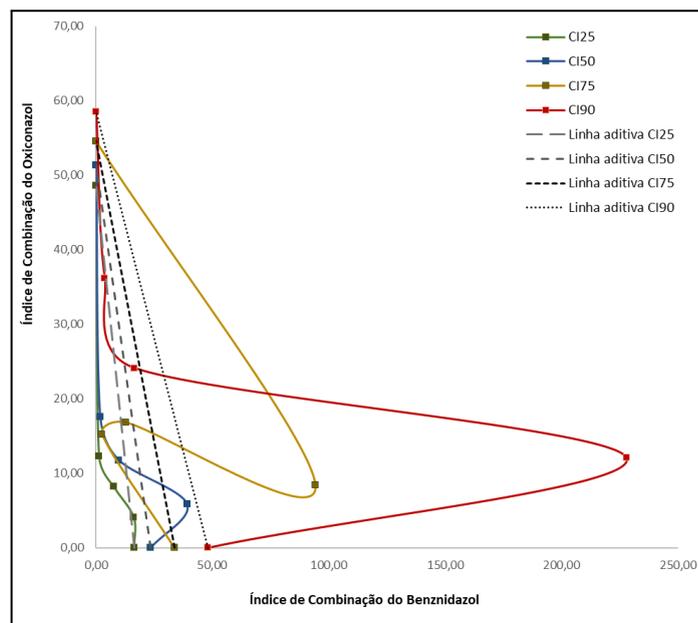
Com o objetivo de representar graficamente o efeito das referidas associações, que causaram 25%, 50%, 75% e 90% do efeito dos fármacos utilizados na associação foi confeccionado um isoblograma para cada combinação (Figuras 7 e 8). As linhas pontilhadas indicam o limite de efeito aditivo para cada percentual de inibição. Todas as concentrações inibitórias da combinação de nitrato de oxiconazol com lansoprazol se encontram abaixo da linha aditiva, enquanto o isoblograma da combinação de nitrato de oxiconazol e benznidazol apresenta pontos acima e abaixo da linha aditiva.

Figura 7 - Isoblograma ilustrando os efeitos da combinação entre os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol sobre epimastigotas de *T. cruzi*.



Nota: Os pontos abaixo das linhas aditivas representam sinérgismo; pontos acima da linha aditiva representam antagonismo e pontos sobre a linha aditiva representam efeito aditivo.

Figura 8 - Isoblograma ilustrando os efeitos da combinação entre os fármacos benznidazol e nitrato de oxiconazol sobre epimastigotas de *T. cruzi*.

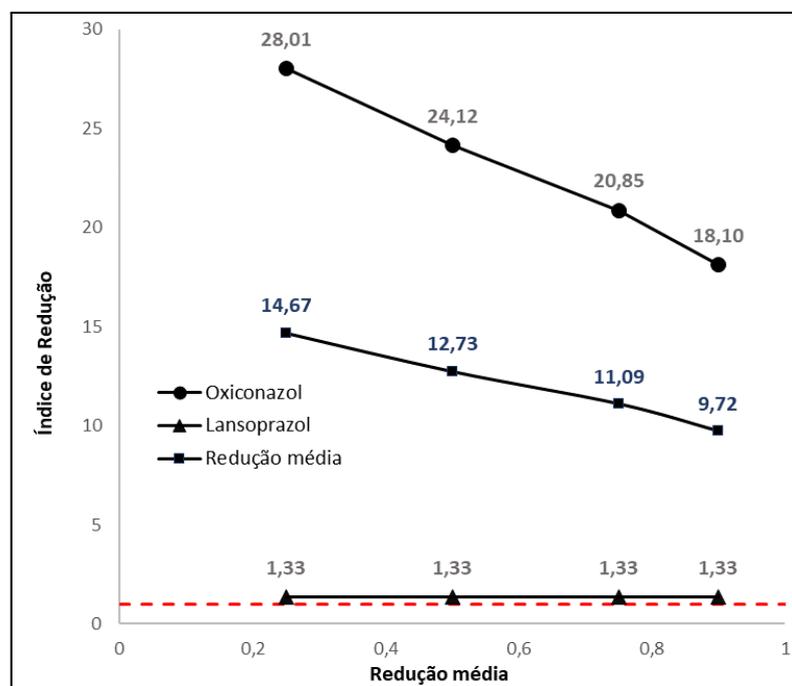


Nota: Os pontos abaixo das linhas aditivas representam sinérgismo; pontos acima da linha aditiva representam antagonismo e pontos sobre a linha aditiva representam efeito aditivo.

5.3 Índice de Redução de Dose

O lansoprazol foi capaz de reduzir em mais de 28 vezes a concentração de nitrato de oxiconazol necessária para atingir a CI_{25} na proporção de 3:1, com variação nos valores de redução da dose de nitrato de oxiconazol entre 18,1 e 28 vezes. A combinação também promoveu discreta redução na dose ativa de lansoprazol em todas as concentrações inibitórias, com valor de 1,33 (Figura 9).

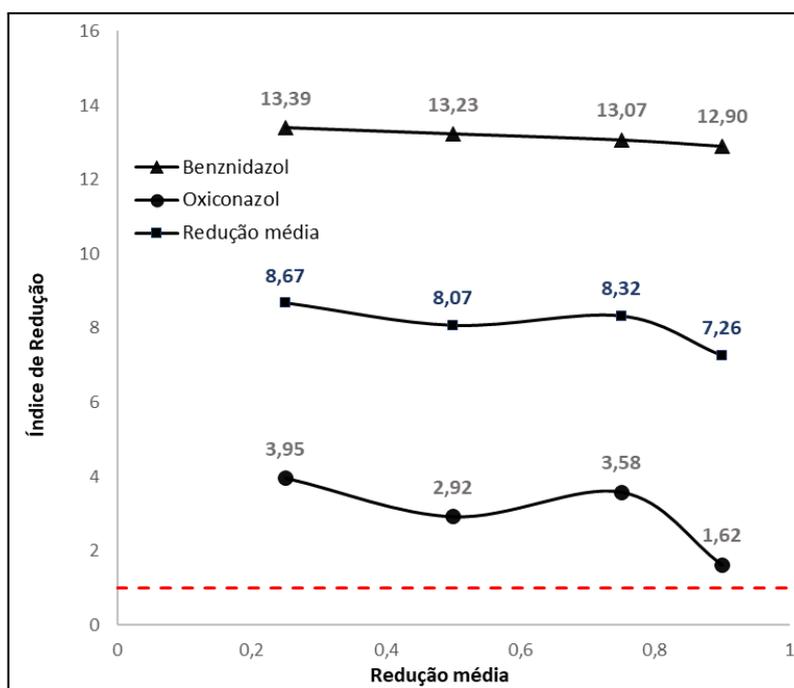
Figura 9 - Índices de redução das diferentes proporções das combinação de lansoprazol e nitrato de oxiconazol testadas sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Nota: Cada ponto representa uma concentração na combinação, a saber, da esquerda para a direita: CI_{25} , CI_{50} , CI_{75} e CI_{90} .

A combinação de benznidazol e nitrato de oxiconazol promoveu uma diminuição na concentração de benznidazol necessária para causar redução na viabilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* em aproximadamente 13 vezes em todas as CIs. O nitrato de oxiconazol combinado também teve sua dose reduzida de 1,62 a 3,95 vezes (Figura 10).

Figura 10 - Índices de redução das diferentes proporções das combinação de benznidazol e nitrato de oxiconazol testadas sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Nota: Cada ponto representa uma concentração na combinação, a saber, da esquerda para a direita: CI_{25} , CI_{50} , CI_{75} e CI_{90} .

5.4 Análise de citotoxicidade e Índice de Seletividade

A citotoxicidade dos fármacos não combinados foi determinada através de ensaio com MTT. O fármaco nitrato de oxiconazol apresentou maior citotoxicidade, enquanto o fármaco lansoprazol não apresentou citotoxicidade, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Citotoxicidade (CC_{50}) dos fármacos não combinados testados *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* após 72 horas de exposição.

Fármacos	CC_{50}	R^2	Intervalo de Confiança
Nitrato de Oxiconazol	52,1 μ M	0,71	35,2 – 77,1 μ M
Lansoprazol	NC até 541,4 μ M	*	*
Benznidazol	637,5 μ M	0,89	563,5 – 721,2 μ M

Legenda: CC_{50} - Concentração Citotóxica para 50% dos parasitos testados; R^2 - Coeficiente de determinação; NC - Não Citotóxico.

Nota: (*) Não foi possível calcular devido a viabilidade ser próxima de 100%.

A combinação de nitrato de oxiconazol com lansoprazol não apresentou citotoxicidade nas proporções de 1:3 e 1:1, enquanto que na proporção de 3:1 houve um aumento significativo de toxicidade, com CC_{50} de 6,5 μ M. Na combinação de benznidazol com oxiconazol todas as proporções apresentaram citotoxicidade elevada, com valores de CC_{50} inferiores aos dos fármacos isolados. O valores do IS foram inferiores a 1,0 indicando baixa seletividade pelas formas epimastigotas de *T. cruzi* em relação às células animais em todas as proporções da combinação de benznidazol:nitrato de oxiconazol, assim como na proporção 3:1 de nitrato de oxiconazol:lansoprazol (tabela 5).

Tabela 5 - Citotoxicidade (CC_{50}) e índice de seletividade (IS) dos fármacos combinados testados *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* após 72 horas de exposição.

Combinação	Proporção	CC_{50}	IS	R²	Intervalo de Confiança
Nitrato de Oxiconazol: Lansoprazol	1:3	NC até 868,1 μ M	*	*	*
	1:1	NC até 582,6 μ M	*	*	*
	3:1	6,5 μ M	0,14	0,76	4,4 – 9,6 μ M
Benznidazol: Nitrato de Oxiconazol	1:3	39,6 μ M	0,76	0,83	21,9 – 41,9 μ M
	1:1	21,0 μ M	1,07	0,78	10,5 – 41,2 μ M
	3:1	11,0 μ M	1,55	0,51	4,0 – 30,3 μ M

Legenda: CC_{50} - Concentração Citotóxica para 50% dos parasitos testados; IS - Índice de Seletividade; R2 - Coeficiente de determinação; NC - Não Citotóxico.

Nota: (*) Não foi possível calcular devido a viabilidade ser próxima de 100%.

6 DISCUSSÃO

Ainda que os impactos sanitários, econômicos e sociais da DC sejam significativos, não houve mudanças no panorama de tratamento da infecção. Os fármacos utilizados para o seu tratamento mantêm-se os mesmos desde o seu desenvolvimento há mais de 50 anos. Esse cenário é resultado de um complexo problema de saúde, de forma que a DC foi incluída pela OMS na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas em 2005 na busca de promover o reconhecimento e incentivar os esforços na melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento da doença (WHO, 2024a).

A estratégia do uso de combinações de fármacos com atividade tripanocida selecionados através de estudos de reposicionamento já vem sendo utilizada na busca de efeitos aditivos ou de sinergismo que possam potencializar seu efeito anti-*T. cruzi* (Nogueira *et al.*, 2022). Outra abordagem que vem sendo amplamente utilizada é a combinação de fármacos reposicionados com os fármacos já padronizados para o tratamento da DC, nifurtimox ou benznidazol, com o intuito de diminuir seus efeitos adversos significativos e aumentar a sua eficácia (Almeida-Silva *et al.*, 2022; Barbosa *et al.*, 2022; Morillo *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2022; Strauss *et al.*, 2018).

Dentre as classes de fármacos explorados, os antifúngicos azóis estão entre os principais alvos de estudos de combinação, pois atuam em uma via biossintética semelhante à observada em *T. cruzi* para a síntese de esteróis (Roberts *et al.*, 2003). Estudo que investigou através de testes *in vitro* os efeitos da combinação de benznidazol com o antifúngico itraconazol verificou que os efeitos da combinação foram quatro vezes mais efetivos quando comparados com os tratamentos isolados (Assíria Fontes Martins *et al.*, 2015). O presente estudo encontrou resultados similares, com a diminuição de aproximadamente 3 vezes do CI_{50} da combinação de benznidazol com nitrato de oxiconazol na proporção de 3:1 em relação aos fármacos não combinados, demonstrando potencial para redução das doses dos fármacos quando utilizados em combinação.

No entanto, no âmbito das terapias combinadas com antifúngicos azóis os resultados ainda são controversos. Embora as associações do benznidazol com os antifúngicos posaconazol e voriconazol tenham sido avaliadas como potenciais candidatas para o tratamento da DC, estudos indicam que a terapia combinada não apresentou eficácia superior

à monoterapia com benznidazol (Gulin *et al.*, 2020; Morillo *et al.*, 2017). Contudo, os achados do *The STOP-CHAGAS Trial*, que investigou a associação de posaconazol com benznidazol, foram questionados por Urbina (2017), destacando limitações como a baixa dosagem de posaconazol utilizada e o curto período de testes. Esses fatores ressaltam a necessidade de mais pesquisas para avaliar a combinação de azóis com o benznidazol e explorar seu real potencial no tratamento da DC, considerando que por serem evolutivamente mais antigos que os fungos, os tripanossomatídeos exigem requisitos adicionais para que os fármacos à base de azóis sejam eficazes devido as suas diferenças metabólicas, especialmente no que diz respeito à farmacocinética e à distribuição tecidual (Friggeri *et al.*, 2018).

Com base na seleção realizada por Garcia (2022), os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol foram indicados por apresentarem potencial atividade sobre alvos funcionais de *T. cruzi*. Sendo assim, neste estudo foram testados *in vitro* frente a formas epimastigotas, onde os resultados indicaram que o fármaco nitrato de oxiconazol apresentou maior atividade tripanocida. Dessa forma o nitrato de oxiconazol foi selecionado para a realização dos ensaios de combinação com os fármacos lansoprazol e benznidazol devido ao seu potencial na diminuição do CI_{50} em comparação ao resultado obtido nos testes de MTS com lansoprazol. Os cálculos de IC e IRD foram baseados em suas concentrações.

Os resultados deste estudo demonstraram que a combinação de nitrato de oxiconazol com benznidazol foi capaz de reduzir em até 13 vezes a concentração necessária para a atividade anti-*T. cruzi* do benznidazol *in vitro*, evidenciando o potencial terapêutico dessa associação. Apesar da ocorrência de efeito antagonista em algumas concentrações, foi possível observar sinergismo em praticamente todas as proporções testadas, exceto na proporção 1:3. Por outro lado, verificou-se um acréscimo significativo na citotoxicidade da combinação em comparação aos fármacos isolados, além de seu baixo índice de seletividade, o que demonstra uma baixa diferença entre a citotoxicidade apresentada contra *T. cruzi* e a citotoxicidade apresentada contra as células animais. Esses resultados diminuem seu potencial como alternativa ao tratamento utilizado atualmente.

Uma das principais limitações na utilização dos azóis é sua citotoxicidade, especialmente a toxicidade hepatocelular (Rakhshan *et al.*, 2023). Estudo realizado por Haegler e colaboradores. (2017) verificou que a toxicidade de cetoconazol, um derivado imidazólico, e de posaconazol, um triazol, está relacionada à depleção de ATP nas células

animais e à disfunção mitocondrial, afetando diretamente o metabolismo energético celular. Evidências demonstraram que a toxicidade mitocondrial pode ser ainda mais acentuada em células com função mitocondrial comprometida, agravando os danos hepáticos. A compreensão desses mecanismos de toxicidade é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que minimizem os efeitos adversos dos azóis, contribuindo para o uso mais seguro e eficaz dessa classe de fármacos.

Embora nesses experimentos o lansoprazol não tenha causado redução na viabilidade celular quando utilizado isoladamente, os resultados de sua combinação com nitrato de oxiconazol demonstraram que quando os fármacos são combinados, observa-se diminuição significativa do valor de CI_{50} de nitrato de oxiconazol, além da diminuição em até 28 vezes de sua dose necessária para a redução do crescimento parasitário, sugerindo alguma alteração farmacodinâmica que potencializou o efeito citotóxico contra *T. cruzi* apresentado pelo nitrato de oxiconazol. Essa estratégia tem sido aplicada a azóis e outros agentes antimicrobianos e antifúngicos para aumentar a eficácia dessa classe de fármacos e reduzir o desenvolvimento de resistência microbiana (Stenkiewicz-Witeska; Ene, 2023).

Entre os mecanismos relacionados a potencialização dos azóis nas infecções fúngicas estão a inibição das bombas de efluxo, a intensificação da inibição da síntese de ergosterol, a atenuação da resistência fúngica aos azóis e a interrupção de processos biológicos como a divisão celular e o transporte de nutrientes (Xiong; Lu; Jiang, 2025). Dentre os fármacos estudados que apresentam efeito sinérgico aos azóis estão os IBPs, como lansoprazol e omeprazol. As bombas de prótons nas membranas fúngicas, assim como em *T. cruzi*, são essenciais para a geração do potencial de membrana, facilitando o transporte de nutrientes e o efluxo de fármacos dependente de ATP, tornando os fármacos que atuam em sua inibição candidatos relevantes na busca de efeitos sinérgicos (Holmes *et al.*, 2016).

Em estudo com IBPs, incluindo o lansoprazol, Lu e colaboradores (2020) verificou que esses fármacos atuam sinergicamente com fluconazol contra *Candida albicans* resistente tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O estudo revelou que os efeitos sinérgicos podem estar relacionados à supressão da bomba de efluxo, inibição da fosfolipase extracelular e bloqueio da mudança morfológica. Nesse estudo, assim como no presente estudo, foi constatado que os IBPs quando não combinados apresentam baixa atividade contra os microrganismos, porém

sua combinação com os azóis potencializa a capacidade tóxica dos azóis, com diminuição nas concentrações inibitórias de viabilidade celular.

Por fim, a análise de citotoxicidade das combinações de nitrato de oxiconazol com lansoprazol sobre células Vero, realizada por meio do ensaio de MTT, demonstrou que as proporções 1:3 e 1:1 não reduziram a viabilidade celular das células animais, demonstrando alta seletividade pela célula do parasito em relação às células animais. Em comparação com o perfil de citotoxicidade dos fármacos não combinados, é possível verificar que sua combinação possibilita mitigar seus efeitos citotóxicos, sem prejudicar a ação tóxica frente aos parasitos.

A ausência de relatos na literatura sobre a ação combinada de oxiconazol com benznidazol ou lansoprazol na inibição da viabilidade de *T. cruzi* demonstra a relevância dos resultados apresentados neste estudo. Destaca-se a importância do desenvolvimento de pesquisas futuras que explorem a ação biológica dessas combinações em diferentes formas evolutivas do parasito e que contemplem outras cepas de *T. cruzi*, de forma a aprofundar o entendimento dos mecanismos envolvidos e avaliar o potencial terapêutico dessas associações no tratamento etiológico da DC.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados concluímos que os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol apresentam efeito sinérgico quando combinados, com diminuição do CI_{50} . A combinação de nitrato de oxiconazol com benznidazol, embora apresente proporções com efeito antagonista, apresenta efeito sinérgico nas proporções 1:1 e 3:1. Ambas as combinações testadas demonstraram potencial para a redução das doses necessárias para atingir o efeito anti-*T. cruzi* verificado no tratamento não combinado. Constatou-se que a combinação de nitrato de oxiconazol com benznidazol apresentou incremento em sua citotoxicidade e baixo índice de seletividade pelas formas epimastigotas em relação às células animais, sendo considerada uma desvantagem na sua aplicação. Por fim, as proporções 1:3 e 1:1 da combinação de nitrato de oxiconazol com lansoprazol testadas exibiram efeito citotóxico inferior quando comparado aos tratamentos isolados e alta seletividade, o que demonstra o potencial da diminuição nos efeitos adversos relacionados ao tratamento e corroboram com a sugestão de um tratamento eficaz e de baixa toxicidade.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A principal limitação do estudo é a utilização das formas epimastigotas (replicativas) que são encontradas no inseto vetor, não tendo sido realizados testes nas formas presentes no hospedeiro vertebrado - amastigota e tripomastigota.

A forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* Dm28c foi escolhida para os testes por se tratar de uma população clonal, com crescimento exponencial em cultura axênica, o que possibilita a disponibilidade de quantidade suficiente de parasitos para realização de testes a cada três dias, com uniformidade dos ensaios.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados encontrados, as perspectivas futuras são a realização de ensaios para a pesquisa de atividade tripanocida nas formas tripomastigota e amastigota com os fármacos combinados investigados nesse estudo (nitrato de oxiconazol:lansoprazol e benznidazol:nitrato de oxiconazol) e também com a combinação de lansoprazol e benznidazol.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALMEIDA-SILVA, Juliana *et al.* The repositioned drugs disulfiram/diethyldithiocarbamate combined to benznidazole: Searching for Chagas disease selective therapy, preventing toxicity and drug resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 926699, 2022.

ANDREWS, Katherine T.; FISHER, Gillian; SKINNER-ADAMS, Tina S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 95–111, 2014.

ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.

ASLETT, Martin *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 38, n. suppl_1, p. D457–D462, 2010.

ASSÍRIA FONTES MARTINS, Tassiane *et al.* Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0128707, 2015.

AZAMBUJA, Patrícia; GARCIA, Eloi S. Fisiologia - Portal da Doença de Chagas. *In*: 2017. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/vetor/fisiologia/>. Acesso em: 13 dez. 2024.

BALDONI, Nayara Ragi *et al.* Gastrointestinal manifestations of Chagas disease: a systematic review with meta-analysis. [s. l.], 2024.

BARBOSA, Juliana Magalhães Chaves *et al.* Experimental combination therapy with amiodarone and low-dose benznidazole in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* acute infection. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. e01852-21, 2022.

BARRADELL, Lee B.; FAULDS, Diana; MCTAVISH, Donna. Lansoprazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy in acid-related disorders. **Drugs**, [s. l.], v. 44, p. 225–250, 1992.

BELLERA, Carolina L *et al.* *In silico* drug repositioning for Chagas disease. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 662–675, 2020.

BELTRAN-HORTELANO, Iván *et al.* Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 58, p. 116577, 2022.

BELTRAN-HORTELANO, Iván *et al.* The role of imidazole and benzimidazole heterocycles in Chagas disease: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 206, p. 112692, 2020.

BIAGIOTTI, Michael *et al.* Lipidomics and anti-trypanosomatid chemotherapy. **Clinical and Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, p. 1–11, 2017.

BOOTH, Leigh-Ann; SMITH, Terry K. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A review.

Molecular and biochemical parasitology, [s. l.], v. 240, p. 111324, 2020.

BORGES-PEREIRA, José *et al.* Doença de Chagas na população urbana do distrito sanitário de Rio Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 34, p. 459–466, 2001.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/arquivos/boletim-epidemiologico-volume-46-no-21-2015-doenca-de-chagas-aguda-no-brasil-serie-historica-de-2000-a-2013.pdf>.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Análise descritiva: um ano de implementação da notificação de doença de Chagas crônica no Brasil**, Brasília: Ministério da Saúde, 2024.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. Brasília: Ministério da Saúde: [s. n.], 2022.

BRENER, Zigman. *Biology of Trypanosoma cruzi*. [s. l.], 1973.

BRINGAUD, Frédéric; RIVIÈRE, Loïc; COUSTOU, Virginie. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 1–9, 2006.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed.** [S. l.]: McGraw Hill Brasil, 2012. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=qsx4cIAwwtC>.

BUCKNER, Frederick S; URBINA, Julio A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s. l.], v. 2, p. 236–242, 2012.

CARVALHO, Técia Ulisses de. Organização Estrutural - Portal da Doença de Chagas. *In*: 2017. Disponível em: Acesso em: 13 dez. 2024.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 1, p. 159–218, 1909.

CHOI, Jun Yong; PODUST, Larissa M; ROUSH, William R. Drug strategies targeting CYP51 in neglected tropical diseases. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 114, n. 22, p. 11242–11271, 2014.

CHOU, Ting-Chao. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer research**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 440–446, 2010.

CHOU, Ting-Chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.

COMINETTI, Marlon Cezar *et al.* Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in

triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 747–755, 2014.

COMINETTI, Marlon Cezar *et al.* Monitoring *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 277–280, 2013.

CONTRERAS, Victor T. *et al.* *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 102, p. 113–122, 2007.

COURA, José Rodrigues. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 104, p. 549–554, 2009.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 277–282, 2014.

COURA, José Rodrigues. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 30–33, 2003.

CUCUNUBÁ, Zulma M. *et al.* The epidemiology of Chagas disease in the Americas. **The Lancet Regional Health – Americas**, [s. l.], v. 37, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100881>. Acesso em: 5 dez. 2024.

DA SILVA, Alison Pontes *et al.* Doenças negligenciadas e indústria farmacêutica: o caso da Doença de Chagas. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e21110212419–e21110212419, 2021.

DA SILVA, Newton Neves *et al.* Surto epidêmico da doença de Chagas com provável contaminação oral. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 265–76, 1968.

DE ALMEIDA, Ayssa Marinho Vitorino *et al.* Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e de transmissão Chagas disease: Epidemiological, physiopathological and transmission aspects. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 18931–18944, 2021.

DE ALMEIDA, Julio Menta *et al.* Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isoobtusalactone A in short exposure of time. **Plos one**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. e0245882, 2021.

DE AQUINO, Giovana Parreira *et al.* Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids. **Microbial Cell**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 262, 2021.

DE SOUSA, Andréa Silvestre *et al.* Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 403, n. 10422, p. 203–218, 2024.

DE SOUZA, Wanderley. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, [s. l.], v. 86, p. 197–283, 1984.

DE SOUZA, Wanderley. Doenças negligenciadas. [s. l.], Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos, p. 56, 2010.

DE SOUZA, Wanderley; VIDAL, Juliana. Cultivo - Portal da Doença de Chagas. *In*: 2017. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>. Acesso em: 13 dez. 2024.

DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. [S. l.]: Editora Fiocruz, 1997.

DNDI. DNDi Chagas Hit-to-lead. *In*: 2025. Disponível em: <https://dndi.org/research-development/portfolio/chagas-h2l/>. Acesso em: 25 fev. 2025.

DOCAMPO, Roberto *et al.* Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 169–180, 1981.

DRUGBANK. Lansoprazole. 2024a. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00448>. Acesso em: 10 dez. 2024.

DRUGBANK. Oxiconazole. 2024b. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00239>. Acesso em: 10 dez. 2024.

ECHAVARRÍA, Natalia Giraldo *et al.* Chagas disease: chronic Chagas cardiomyopathy. **Current problems in cardiology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 100507, 2021.

ECHEVERRIA, Luis E; MORILLO, Carlos A. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.

EKINS, Sean *et al.* *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 298–310, 2011.

FIDALGO, Arduina Sofia Ortet de Barros Vasconcelos *et al.* Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 51, n. 02, p. 174–182, 2018.

FRIGGERI, Laura *et al.* Sterol 14 α -demethylase structure-based optimization of drug candidates for human infections with the protozoan Trypanosomatidae. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 23, p. 10910–10921, 2018.

GARCIA, Caroline Silva. **Estudo de reposicionamento de fármacos com potencial atividade contra enzimas do metabolismo de *Trypanosoma cruzi***. Orientador: Alda Maria Teixeira Ferreira. 2022. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/4748>. Acesso em: 24 out. 2022.

GARCÍA-TORRES, Itzhel *et al.* Repurposing of rabeprazole as an anti-*Trypanosoma cruzi* drug that targets cellular triosephosphate isomerase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 2231169, 2023.

GOLAN, David *et al.* Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. In: PRINCÍPIOS DE FARMACOLOGIA: A BASE FISIOPATOLÓGICA DA FARMACOTERAPIA. [S. l.: s. n.], 2009. p. xxiv–952.

GONZÁLEZ-SALAZAR, Constantino *et al.* Toward new epidemiological landscapes of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) transmission under future human-modified land cover and climatic change in Mexico. **Tropical medicine and infectious disease**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 221, 2022.

GULIN, Julián Ernesto Nicolás *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of voriconazole and benznidazole combination on *Trypanosoma cruzi* infection models. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 211, p. 105606, 2020.

GUPTA, Yash *et al.* Repurposing Lansoprazole and Posaconazole to treat Leishmaniasis: Integration of *in vitro* testing, pharmacological corroboration, and mechanisms of action. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 128, 2022.

HAEGLER, Patrizia *et al.* Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 157, n. 1, p. 183–195, 2017.

HALL BELINDA S.; WILKINSON SHANE R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 115–123, 2012.

HALL, Belinda S.; BOT, Christopher; WILKINSON, Shane R. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 286, n. 15, p. 13088–13095, 2011.

HENRIQUES, Cristina *et al.* Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 2148–2155, 2011.

HIGH, Whitney A.; FITZPATRICK, James E. Topical antifungal agents. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**, [s. l.], v. 8, p. 2116–21, 2012.

HOCHBERG, Natasha S; MONTGOMERY, Susan P. Chagas disease. **Annals of internal medicine**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. ITC17–ITC32, 2023.

HOLMES, Ann R *et al.* Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1485–1501, 2016.

JOURDAN, Jean-Pierre *et al.* Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 1145–1151, 2020.

KALE, Mayura A *et al.* Drug repositioning: a unique approach to refurbish drug discovery. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–8, 2022.

KLEIN, Melissa D *et al.* Risk factors for vertical transmission of Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 105, p. 357–373, 2021.

LAPORTA, Gabriel Zorello *et al.* Estimativa de prevalência de doença de Chagas crônica nos municípios brasileiros. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s. l.], v. 48, p. 1, 2024.

LEPESHEVA, Galina I; FRIGGERI, Laura; WATERMAN, Michael R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 14, p. 1820–1836, 2018.

LEY, Victoria *et al.* Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 168, n. 2, p. 649–659, 1988.

LIN, Yushi *et al.* Global burden and trends of neglected tropical diseases from 1990 to 2019. **Journal of Travel Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. taac031, 2022.

LIU, Zongyuan; ULRICH VONBARGEN, Rebecca; MCCALL, Laura-Isobel. Central role of metabolism in *Trypanosoma cruzi* tropism and Chagas disease pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 63, p. 204–209, 2021.

LU, Mengjiao *et al.* Proton pump inhibitors act synergistically with fluconazole against resistant *Candida albicans*. **Scientific reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 498, 2020.

MAGARIÑOS, María P *et al.* TDR Targets: a chemogenomics resource for neglected diseases. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 40, n. D1, p. D1118–D1127, 2012.

MANSOLDO, Felipe Raposo Passos *et al.* Chagas disease: Perspectives on the past and present and challenges in drug discovery. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5483, 2020.

MARTINS, Mariana Furquim da Silva *et al.* Serological and molecular inquiry of Chagas disease in an Afro-descendant settlement in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. e0189448, 2018.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio; CASTRO, Marcia C.; WERNECK, Guilherme Loureiro. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 220, p. 105948, 2021.

MATHESON, Anna J.; JARVIS, Blair. Lansoprazole. **Drugs**, [s. l.], v. 61, n. 12, p. 1801–1833, 2001.

MAUGERI, Dante A; CANNATA, Joaquin JB; CAZZULO, Juan-José. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Essays in biochemistry**, [s. l.], v. 51, p. 15–30, 2011.

MICHELS, Paul A. M. *et al.* Carbohydrate metabolism in trypanosomatids: New insights revealing novel complexity, diversity and species-unique features. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 224, p. 108102, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema De Informação De Agravos De Notificação. Secretaria

de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *In*: 2025. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinanet/cnv/chagasms.def>. Acesso em: 26 fev. 2025.

MORILLO, Carlos A *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

NERY-GUIMARÃES, F *et al.* Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). **Hospital**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 1767–1804, 1968.

NOGUEIRA, Silas Santana *et al.* Monotherapy and combination chemotherapy for Chagas disease treatment: A systematic review of clinical efficacy and safety based on randomized controlled trials. **Parasitology**, [s. l.], v. 149, n. 13, p. 1679–1694, 2022.

OPPERDOES, Fred R; MICHELS, Paul AM. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 31, n. 5–6, p. 482–490, 2001.

PAHO, Pan American Health Organization. Chagas Disease in the Americas: An Analysis of the Current Situation and Strategic Review of the Regional Agenda. Final Report, 14–16 March 2023, Medellín (Colombia). [s. l.], 2023. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/58664>. Acesso em: 5 dez. 2024.

PANDEY, Ramendra P. *et al.* Drug Repurposing in Chagas Disease: Chloroquine Potentiates Benznidazole Activity against *Trypanosoma cruzi* *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. e00284-22, 2022.

PAPPALARDO, Francesco *et al.* *In silico* clinical trials: concepts and early adoptions. **Briefings in bioinformatics**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1699–1708, 2019.

PÉREZ-MOLINA, Jose A. *et al.* Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 458–470, 2021.

PÉREZ-MOLINA, José A; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

POMPILIO, Maurício Antonio *et al.* Aspectos epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença de Chagas em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 38, p. 473–478, 2005.

PORTA, Exequiel OJ; KALESH, Karunakaran; STEEL, Patrick G. Navigating drug repurposing for Chagas disease: advances, challenges, and opportunities. **Frontiers in pharmacology**, [s. l.], v. 14, p. 1233253, 2023.

QUIÑONES, Wilfredo *et al.* Structure, properties, and function of glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 25, 2020.

RAAFLAUB, J; ZIEGLER, WH. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-forschung**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1611–1614, 1979.

RAKHSHAN, Amin *et al.* Hepatotoxicity Induced by Azole Antifungal Agents: A Review Study. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. e130336, 2023.

RAMAKRISHNAN, Srinivasan *et al.* Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 488–512, 2013.

RANG, Rang *et al.* **Rang & dale farmacologia**. [S. l.]: Elsevier Brasil, 2015.

RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

ROBERTS, CW *et al.* Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and biochemical parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 2, p. 129–142, 2003.

SAMPAIO, George Harisson Felinto *et al.* Epidemiological profile of acute Chagas disease in individuals infected by oral transmission in northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 53, p. e20200088, 2020.

SANTANA, Rosa Amélia G *et al.* Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 132, 2019.

SANT'ANNA, Celso *et al.* New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 71, n. 8, p. 599–605, 2008.

SHIN, Jai Moo; KIM, Nayoung. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. **Journal of neurogastroenterology and motility**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 25, 2013.

STENKIEWICZ-WITESKA, Jan S.; ENE, Iuliana V. Azole potentiation in *Candida* species. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. e1011583, 2023.

STRAUSS, Mariana *et al.* *In vitro* and *in vivo* drug combination for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection: A multivariate approach. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 189, p. 19–27, 2018.

SWETT, Michael C *et al.* Chagas Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Current cardiology reports**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1105–1112, 2024.

TEIXEIRA, Antonio RL; NASCIMENTO, Rubens J; STURM, Nancy R. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 101, p. 463–491, 2006.

TIAN, Yuexun; DURDEN, Cassandra; HAMER, Gabriel L. A scoping review of triatomine control for Chagas disease prevention: current and developing tools in Latin America and the

United States. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], p. tjae043, 2024.

TOMASINA, Ramiro *et al.* From Trypomastigotes to Trypomastigotes: Analyzing the One-Way Intracellular Journey of *Trypanosoma cruzi* by Ultrastructure Expansion Microscopy. **Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 866, 2024.

URBINA, Julio A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 287–295, 2002.

URBINA, Julio A. Pharmacodynamics and Follow-Up Period in the Treatment of Human *Trypanosoma Cruzi* Infections With Posaconazole. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 299–300, 2017.

URBINA, Julio A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 115, n. 1, Chagas disease: 100 years of the discovery and beyond, p. 55–68, 2010.

VANDERHEYDEN, Nicole; BENAÏM, Gustavo; DOCAMPO, Roberto. The role of a H⁺-ATPase in the regulation of cytoplasmic pH in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochemical journal**, [s. l.], v. 318, n. 1, p. 103–109, 1996.

VIEIRA, Mauricio *et al.* Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 392, n. 3, p. 467–474, 2005.

VISHWAKARMA, Monika; HAIDER, Tanweer; SONI, Vandana. Update on fungal lipid biosynthesis inhibitors as antifungal agents. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 278, p. 127517, 2024.

WANG, Yunxia *et al.* Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 48, n. D1, p. D1031–D1041, 2020.

WHO. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). , 2024a. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) . Acesso em: 10 dez. 2024.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). , 2024b. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/en/>. Acesso em: 10 dez. 2024.

WHO. **Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee**. [S. l.]: World Health Organization, 2002.

WIENS, Matthew O *et al.* Systematic review and meta-analysis of the pharmacokinetics of benznidazole in the treatment of Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 7035–7042, 2016.

WISHART, David S *et al.* DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 36, n. suppl_1, p. D901–D906, 2008.

XIONG, Juan; LU, Hui; JIANG, Yuanying. Mechanisms of Azole Potentiation: Insights from

Drug Repurposing Approaches. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], 2025.

ZINGALES, Bianca *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 104, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, Bianca *et al.* Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 109, n. 06, p. 828–833, 2014.

ZUMA, Aline A; DOS SANTOS BARRIAS, Emile; DE SOUZA, Wanderley. Basic biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 27, n. 14, p. 1671–1732, 2021.