

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

CARLOS MIGUEL DE FREITAS SIMÕES

**AÇÃO DE FÁRMACOS SELECIONADOS *IN SILICO* SOBRE ALVOS
FUNCIONAIS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Campo Grande - MS

2024

CARLOS MIGUEL DE FREITAS SIMÕES

**Ação de fármacos selecionados *in silico* sobre alvos
funcionais em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPG DIP, 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
2024

TERMO DE APROVAÇÃO

CARLOS MIGUEL DE FREITAS SIMÕES

Ação de fármacos selecionados *in silico* sobre alvos funcionais em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Trabalho apresentado ao Programa de Pós Graduação em Doenças
Infecciosas e Parasitárias – PPG DIP, da Fundação Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

_____ de _____ de 2024

Comissão Examinadora:

Prof^a Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira - UFMS

Prof^a. Dra. Inês Aparecida Tozetti - UFMS

Prof^a Dra Eliane Mattos Piranda - UFMS

Prof^a Dra Alessandra Gutierrez de Oliveira (Suplente) - UFMS

Prof^a Dra Maria Carolina Silva Marques (Suplente) - UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me fornecido condições de concluir mais essa etapa na minha jornada;

Agradeço à minha família, meus pais Evany e Osmair, e meus irmãos Even, Mazinho e João, por todo apoio fornecido para que eu chegasse aonde cheguei;

Agradeço aos meus amigos, Jéssica, Letícia e Murilo por terem sido meu Grupo de Apoio desde a graduação, e por me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos;

Agradeço aos amigos que o Mestrado me trouxe, em especial a Ana Isabel, Guilherme e o Wesley por terem estado ao meu lado durante essa aventura que foi o Mestrado;

Agradeço a toda a família LabImunoBio pela recepção e empatia ao longo desses anos. Sou grato ao acolhimento das professoras Inês e Cacilda, e pela amizade construída com os colegas de laboratório, em especial a Carla, Lara e o Pedro;

Agradeço ao Daniel por ter me acompanhado desde o primeiro semestre nessa aventura e me ajudado ao longo desse percurso;

Gostaria ainda de agradecer especialmente a Lis e ao Luiz, meus estagiários, PIBIC e amigos. O suporte de vocês me permitiu concluir esse sonho, e a isso e muitas outras coisas, sou grato a vocês;

E por fim, gostaria de agradecer a maravilhosa professora Alda por toda orientação, carinho, confiança, paciência para que essa etapa fosse concluída;

Agradeço a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo acolhimento ao longo desses anos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PPGDIP) pela oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Agradeço aos órgãos fomentadores CAPES e FUNDECT pela bolsa e pelo financiamento desse projeto.

A todos vocês que de algum modo contribuíram para esse momento, eu deixo meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido predominantemente pelo contato com os dejetos dos insetos vetores conhecidos como “barbeiros”. Embora essa doença represente um grande desafio para a saúde pública, atualmente no Brasil há somente um fármaco para o seu tratamento, o benznidazol, o qual apresenta baixa eficácia na fase crônica e severos efeitos adversos. Sendo assim, a busca por novos fármacos que possam atuar de forma mais segura e eficiente ao longo da infecção torna-se justificável. Visando tal objetivo, este trabalho investigou potenciais alvos funcionais como a replicação, integridade de membrana plasmática, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial, complexidade e tamanho celular de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com a Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) dos fármacos selecionados anteriormente *in silico*, nitrato de oxiconazol e lansoprazol. Trata-se de uma pesquisa experimental, desenvolvida com ensaios *in vitro*, utilizando uma população clonal de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c, mantida sob repiques periódicos em meio Liver Infusion Tryptose (LIT). Para os experimentos foi utilizada a forma epimastigota do parasito, submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de fármacos por 24h para determinação da CI₅₀/24h. Para os ensaios com citometria de fluxo, os parasitos foram tratados com a CI₅₀ de cada fármaco durante 24h. O efeito dos fármacos (CI₅₀) na replicação do parasito também foi avaliado ao longo de 120h. Foram utilizados os *softwares* Microsoft Excel 2020 e *GraphPadPrism* 7.04 para a análise das variáveis tempo de tratamento e fármacos; e os *softwares* FACSDIVA e FlowJo para análise dos dados da citometria. Quanto à análise estatística, os experimentos foram realizados em triplicata, e as diferenças entre o percentual de viabilidade dos parasitos foram comparadas entre os tempos, e para cada fármaco, pela análise de variância (ANOVA), com *post test* de Tukey. Os valores de *p* iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos. Dentre os achados desse trabalho, foi observado que o nitrato de oxiconazol afetou a replicação do parasito, além da capacidade de permeabilizar a membrana citoplasmática e de interferir em seu ciclo celular; o lansoprazol por sua vez apresentou resultados semelhantes ao controle não tratado. Sendo assim, o nitrato de oxiconazol demonstrou ser um candidato promissor como fármaco ativo contra *T. cruzi*. Sugere-se análises complementares para melhor compreensão do possível mecanismo de ação do lansoprazol sobre o microrganismo.

Palavras-chave: Bioensaios. Doença Tropical Negligenciada. Reposicionamento de fármaco.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is an infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted predominantly through contact with the waste of insect vectors known as "barbers". Although this disease represents a major challenge for public health, currently in Brazil there is only one drug for treating the disease, benznidazole, which has low efficacy in the chronic phase and severe adverse effects. The search for new drugs that can act more safely and efficiently throughout the infection is therefore justified. To this end, this study investigated potential functional targets such as replication, plasma membrane integrity, cell cycle, mitochondrial membrane potential, complexity and cell size of *T. cruzi* epimastigotes treated with the 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) of the previously selected drugs *in silico*, oxiconazole nitrate and lansoprazole. This is an experimental study, carried out with *in vitro* assays, using a clonal population of *Trypanosoma cruzi* strain Dm28c, maintained under periodic repiques in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium. The epimastigote form of the parasite was used for the experiments, which were subjected to treatment with different concentrations of drugs for 24 hours to determine the IC₅₀/24h. For the flow cytometry tests, the parasites were treated with the IC₅₀ of each drug for 24 hours. The effect of the drugs (IC₅₀) on parasite replication was also assessed over 120 hours. Microsoft Excel 2020 and GraphPadPrism 7.04 were used to analyze the treatment time and drug variables; and FACSDIVA and FlowJo were used to analyze the cytometry data. As for the statistical analysis, the experiments were carried out in triplicate and the differences between the percentage of parasite viability were compared between the times and for each drug using analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post-test*. *p*-values equal to or less than 0.05 were considered significant. Among the findings of this study, it was observed that oxiconazole nitrate affected the replication of the parasite, in addition to its ability to permeabilize the cytoplasmic membrane and interfere with its cell cycle; lansoprazole in turn showed similar results to the untreated control. Therefore, oxiconazole nitrate is a promising candidate as an active drug against *T. cruzi*. Further analysis is suggested to better understand the possible mechanism of action of lansoprazole on the microorganism.

Keywords: Bioassays. Neglected Tropical Disease. Drug repositioning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 2 - Ciclo de transmissão de <i>Trypanosoma cruzi</i> por via clássica.	15
Figura 3 - Modelo revisto para a evolução do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 4 - Sinal de Romaña.	22
Figura 5 - Fórmula estrutural dos fármacos de escolha no tratamento da doença de Chagas.....	23
Figura 6 - Possível mecanismo de ação do benznidazol.	24
Figura 7 - Fármacos avaliados em processo de reposicionamento.	26
Figura 8 - Fórmula estrutural do nitrato de oxiconazol.	29
Figura 9 - Fórmula estrutural do lansoprazol.....	30
Figura 10 - Concentrações de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol testadas sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Figura 11 - Fórmula para determinar Porcentagem de Viabilidade (PV).....	34
Figura 12 - Estratégia experimental para definição da região correspondente a epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , utilizada nos ensaios de citometria de fluxo. .	35
Figura 13 - Efeito do tempo sobre a viabilidade (%) de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com a $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, benznidazol e lansoprazol.	40
Figura 14 - Análise da Complexidade (SSC) x Tamanho (FSC) de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por citometria de fluxo.	41
Figura 15 - Morfologia de formas epimastigotas tratadas com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol e lansoprazol.	42
Figura 16 - Análise da integridade da membrana citoplasmática de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por citometria de fluxo.	43
Figura 17 - Análise do ciclo celular de formas de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol e benznidazol por citometria de fluxo.	44
Figura 18 - Análise do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por citometria de fluxo.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade celular de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em relação às concentrações testadas de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol.	38
Tabela 2 - CI_{50} de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> durante 24h.	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>.....	12
2.1.1	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.1.2	<i>Discrete Typing Units</i> - DTU	15
2.1.3	Metabolismo lipídico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.1.4	Metabolismo energético de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.2	Doença de Chagas	19
2.2.1	Transmissão	20
2.2.2	Fases da doença	21
2.2.3	Tratamento	23
2.3	Reposicionamento de fármacos	25
2.3.1	Análises <i>in silico</i>	27
2.3.2	Nitrato de oxiconazol	28
2.3.3	Lansoprazol	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Tipo de Estudo	32
4.2	Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
4.3	Equipamentos e reagentes utilizados	32
4.4	Fármacos selecionados para estudo.....	33
4.5	Determinação de $CI_{50}/24h$	33
4.6	Avaliação da replicação.....	34
4.7	Avaliação do tamanho e complexidade.....	35
4.8	Análise da integridade da membrana plasmática.....	36
4.9	Avaliação do ciclo celular.....	36
4.10	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	36
4.11	Análise estatística	37

5	RESULTADOS.....	38
5.1	Determinação de $CI_{50}/24h$	38
5.2	Avaliação da replicação.....	39
5.3	Avaliação do tamanho e complexidade.....	41
5.4	Avaliação da integridade da membrana plasmática.....	42
5.5	Avaliação do ciclo celular.....	44
5.6	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	49
8	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	50
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	52

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões do globo, representando um obstáculo social e econômico, especialmente para os países em desenvolvimento, onde se verifica um maior volume de pessoas acometidas por tais enfermidades (DIAS et al., 2009).

Dentro desse conjunto de doenças, existe a doença de Chagas (DC), descoberta em 1909 e tendo como o agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente esta doença era restrita às áreas rurais e periurbanas da América Latina; porém, a expansão do processo de migração do homem e a capacidade do parasito de infectar diversas espécies de insetos hematófagos, contribuíram para uma mudança desse panorama, elevando o patamar da DC como uma das doenças parasitárias de maior prevalência mundial (OSORIO-MÉNDEZ; CEVALLOS, 2019).

Com o intuito de combater essa doença, existe a necessidade de recursos terapêuticos eficazes, no entanto, há somente dois quimioterápicos disponíveis para o tratamento da DC, o nifurtimox e o benznidazol, sendo este último o fármaco de escolha para o tratamento em território brasileiro. Contudo, ambos os fármacos apresentam uma ação anti - *T. cruzi* variável e muitas vezes limitada a fase aguda da infecção, além da possibilidade de ocorrência de graves efeitos adversos. Este fator justifica a necessidade de desenvolvimento e/ou procura por novos fármacos que apresentem maior eficácia e segurança para o organismo humano (DIAS et al., 2016; OSORIO-MÉNDEZ; CEVALLOS, 2019; URBINA, 2001).

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos envolvem muitas etapas, sendo um processo longo e oneroso. Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos tem gerado grande interesse e se tornado uma estratégia importante nas indústrias farmacêuticas e nos centros de pesquisa, baseando-se na descoberta de novas utilizações para fármacos já aprovados (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014; ASHBURN; THOR, 2004).

Sendo assim, o uso de ferramentas *in silico* para o estudo de reposicionamento de fármacos tornou-se uma estratégia útil para direcionar os ensaios *in vitro* na investigação de atividade biológica frente ao agente etiológico da DC. Recentemente, dois fármacos (nitrato de oxiconazol e lansoprazol) apresentaram atividade *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi* de cepa Dm28c e, portanto, se mostraram

promissores como objeto de estudo para a elucidação de possíveis mecanismos de ação (GARCIA, 2022).

O nitrato de oxiconazol é um antifúngico utilizado para o tratamento de infecções causadas por dermatófitos patogênicos e leveduras. É um derivado imidazólico de amplo espectro, cuja atividade se deve à inibição da biossíntese de ergosterol, componente fundamental para a estabilidade da membrana de *T. cruzi*, assim como de outros microrganismos. Este fármaco tem como foco a enzima lanosterol 14- α -demetilase (E.C. 1.14.14.154), mas age também inibindo a lanosterol sintase (DRUGBANK, 2021a).

O lansoprazol é um fármaco da classe dos inibidores de bomba de prótons, estruturalmente classificado como benzimidazol substituído. O fármaco tem sua ação sob uma enzima que catalisa a etapa final da secreção de ácido gástrico nas células parietais humanas. É eficaz no tratamento de úlceras gástricas e no tratamento da doença do refluxo esofágico, além de outras patologias que envolvam excesso de secreção ácida (BARRADELL; FAULDS; MCTAVISH, 1992; DRUGBANK, 2021b; SHIN; SACHS, 2008).

Diante do exposto, esta proposta tem como finalidade avaliar possíveis alvos funcionais como a replicação, integridade de membrana plasmática, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial, complexidade e tamanho celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28C submetidas ao tratamento com os fármacos nitrato de oxiconazol e lansoprazol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

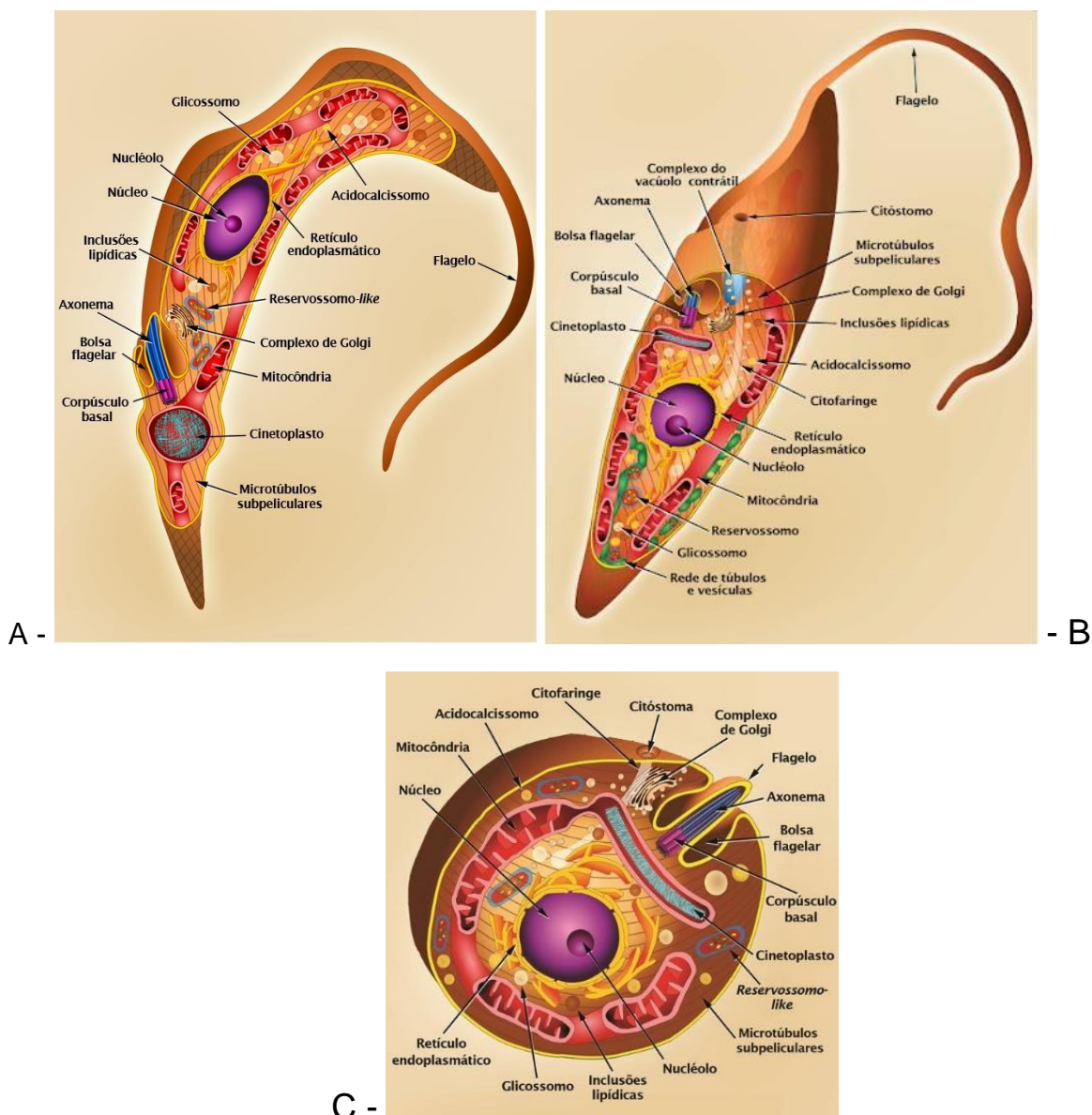
2.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, a qual abrange diversos microrganismos capazes de desencadear doenças parasitárias em animais e vegetais. Aqueles que fazem parte do gênero *Trypanosoma* apresentam a particularidade de uma forma tripomastigota presente no sangue, linfa ou também no fluido intersticial (ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021).

Importante ressaltar que *T. cruzi* é um microrganismo diploide, variando em número e tamanho de cromossomos conforme a cepa analisada. Quanto a sua reprodução, essa ocorre por fissão binária, na qual os clones obtidos podem possuir discretas mutações (GAUNT et al., 2003; SOUZA; VIDAL; ZINGALES, 2017; ZINGALES, 2018).

Em relação à morfologia, *T. cruzi* apresenta três formas (figura 1), as quais podem ser diferenciadas com base na localização do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e a emergência do flagelo. A forma tripomastigota (figura 1A) possui corpo alongado, com a presença visível do flagelo, e cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo; a forma epimastigota (figura 1B) apresenta morfologia elíptica, com flagelo visível e seu cinetoplasto localiza-se de forma que antecede ao núcleo; a forma amastigota (figura 1C) possui aspecto esférico, com flagelo extremamente curto e cinetoplasto em forma de barra na região anterior ao núcleo (CARVALHO; SOUZA; VIDAL, 2017; DIAS; COURA, 1997a).

Figura 1 - Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



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

Fonte: Traduzido de Teixeira e colaboradores (2012).

2.1.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi tem ciclo de vida heteroxênico, ou seja, apresenta dois hospedeiros: o vertebrado, o qual é um mamífero, por exemplo o homem; e o invertebrado, que são insetos, popularmente conhecidos por barbeiros, também chamados de triatomíneos, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Em ambos os hospedeiros o protozoário passa por mudanças morfológicas relevantes (SILVA, 2019).

Na porção anterior do trato digestório do hospedeiro invertebrado é encontrada a forma epimastigota de *T. cruzi*, e durante o período que permanece pelo intestino posterior do agente vetor, devido à carência de nutrientes e ao pH ácido, o parasito sofre um processo de diferenciação conhecido por metaciclogênese, resultando na forma tripomastigota metacíclica, estágio infectante ao hospedeiro vertebrado, forma eliminada por meio dos dejetos do inseto vetor (OLIVEIRA, 2010).

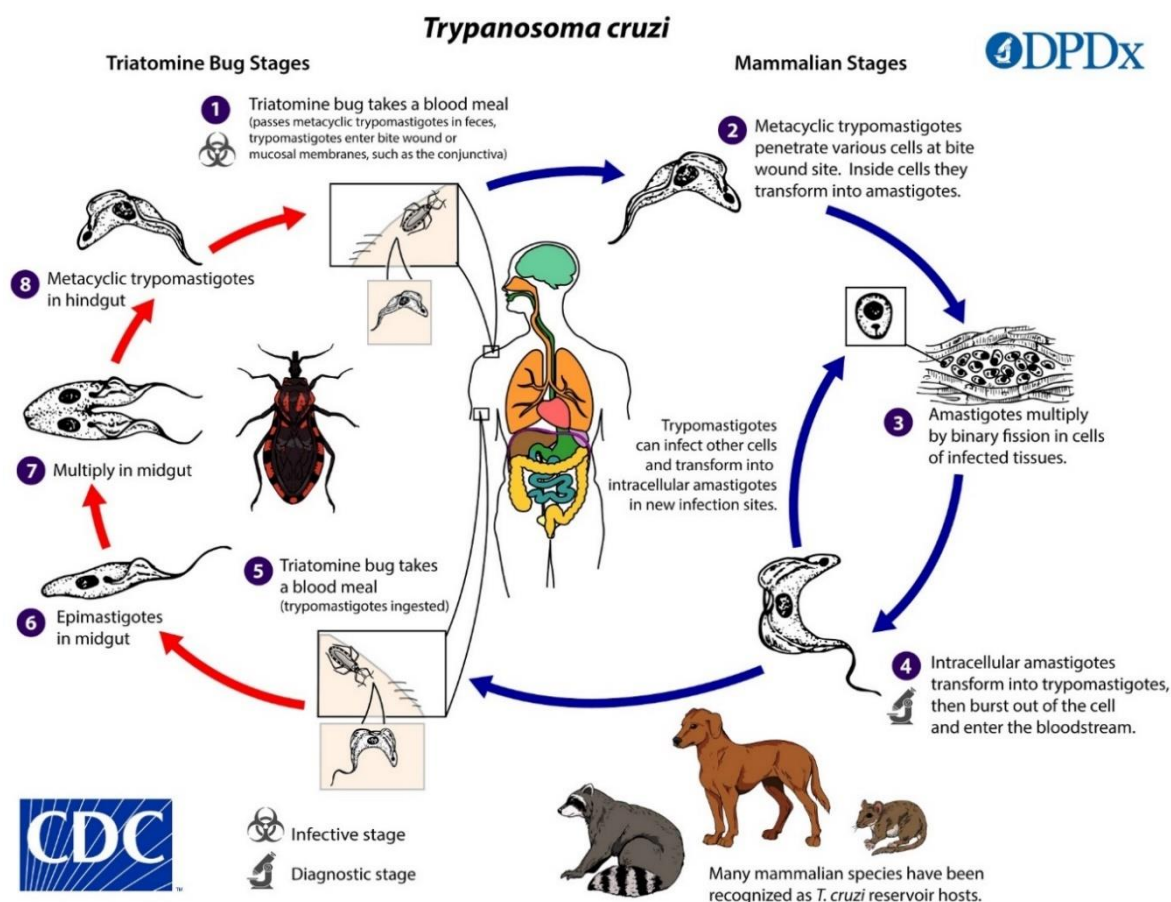
O ciclo no interior do hospedeiro vertebrado inicia com o processo de infecção, que ocorre com a penetração do parasito em sua forma tripomastigota metacíclica, em regiões de mucosa ou lesionadas na pele. Esta forma do parasito possui a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, iniciando o processo pelas células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos e células dendríticas). Uma vez dentro da célula, o parasito passa por alterações, assumindo sua forma replicativa intracelular, a amastigota, através do processo de amastigogênese (AZAMBUJA; GARCIA, 2017).

Após intenso processo de divisão binária, as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigota sanguínea, que devido ao intenso movimento do flagelo, ocasiona lise na célula hospedeira, sendo, portanto, liberadas para a circulação sanguínea e/ou infectando células vizinhas (DIAS; COURA, 1997b).

O ciclo de vida do parasito se completa quando o inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado com formas tripomastigota sanguínea. Após alguns dias desse consumo, o parasito assume novamente a forma epimastigota dentro do inseto e reinicia o processo de replicação, e futuramente o processo de metaciclogênese (AZAMBUJA; GARCIA, 2017).

O ciclo de vida por transmissão vetorial de *T. cruzi* encontra-se ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Ciclo de transmissão de *Trypanosoma cruzi* por via clássica.



Fonte: CDC (2021).

2.1.2 Discrete Typing Units - DTU

Trypanosoma cruzi abrange um grupo geneticamente variável constituído por mais de 70 cepas, as quais demonstram capacidade de interagir com diferentes organismos (animais vertebrados domésticos, silvestres, humanos e insetos vetores). Acredita-se que essa alta capacidade de interação contribuiu para a heterogeneidade biológica e bioquímica desse grupo (DEVERA; FERNANDES; COURA, 2003; GAUNT et al., 2003; MACHADO; AYALA, 2001; MILES et al., 2009).

Na tentativa de melhor compreender e estudar os tripanossomatídeos, diversas abordagens foram publicadas para os classificar. Inicialmente usaram como base suas características morfológicas e seus ciclos de vida (ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, novos modelos de classificação foram propostos, como zimodemas (MILES et al.,

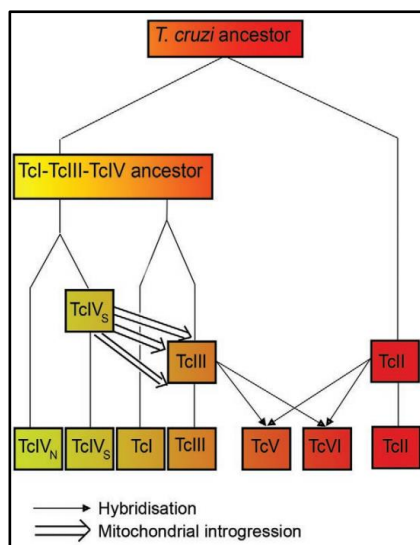
1977, 1978, 1981; ROMANHA et al., 1979), esquizodemas (MOREL et al., 1980), clones (TIBAYRENC; AYALA, 1991), ribodemes (CLARK; PUNG, 1994), linhagens (SOUTO et al., 1996), biodemas (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997), clados (KAWASHITA et al., 2001), e haplótipos (FREITAS et al., 2006; HERRERA et al., 2007).

Desde 1999, quando ocorreu o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas que possuía o objetivo padronizar as linhagens de *T. cruzi*, que o termo *Discrete Typing Units* – DTU passou a ser utilizado. Porém, foi em 2009 com uma nova revisão no sistema de nomenclatura, que de fato adotou-se a nomenclatura DTU (SANTOS, 2014; TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2009).

Desse modo, entende-se por DTU um conjunto de parasitos geneticamente semelhantes entre si, compartilhando marcadores moleculares que diferem daqueles presentes em outros de *T. cruzi*. Dentro desse conjunto há sete DTU: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat (MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2009).

Segundo o modelo (figura 3) elaborado por Tomasini e Diosque (2015), do ancestral em comum resultou dois grupos diferentes: TcII e TcI-TcIII-TcIV. O TcIV separou do grupo monofilogenético e deu origem a dois subgrupos geograficamente diferentes - Sul e Norte - (TcIV_S e TcIV_N). Posteriormente, a TcI e a TcIII se dividiram em dois clados distintos. Após essa separação, o cinetoplasto de TcIV_S foi transferido para TcIII. Posteriormente a esses eventos, ocorreram dois processos de troca genética independentes entre TcII e TcIII, formando TcV e TcVI. Quanto a TcBat, suas análises genéticas a posicionam mais próxima de TcI do que das demais DTUs (MARCILI et al., 2009; PINTO et al., 2012).

Figura 3 - Modelo revisado para a evolução do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Tomasini e Diosque (2015).

A adesão a esse sistema de nomenclatura busca facilitar a percepção de correlações dessas DTUs com características ecoepidemiológicas, ciclo de transmissão e ou até mesmo a forma de manifestação da DC no homem. Já é de conhecimento que todas elas são capazes de provocar a DC e causar cardiomiopatias; há relatos de apenas as TcII, TcV e TcVI associadas a síndromes digestivas crônicas. Simultaneamente, não existem provas de que determinados genótipos do *T. cruzi* são capazes de desencadear desfechos específicos da DC na ausência de outros fatores (DUTRA et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2022).

Ademais, testes *in vitro* e modelos animais (murinos) revelaram que as duas drogas de escolha para o tratamento da DC, benznidazol e nifurtimox, demonstraram uma variação de sua eficácia contra cepas de *T. cruzi* de diferentes DTUs (FRANCO et al., 2015; GRUENDLING et al., 2015; YUN et al., 2009). Estudo elaborado pelo grupo de Médicos Sem Fronteira, com público jovem na América Latina, corroborou tais informações, apontando em seu trabalho diferenças regionais da eficácia do benznidazol (YUN et al., 2009).

No entanto, o genótipo do parasito não pode ser unicamente responsabilizado como a causa da diferença na eficácia dos medicamentos, pois diferenças na resposta imune do hospedeiro, assim como a forma da infecção, condições do vetor e outros fatores podem vir a afetar o tratamento. Por causa dos indícios de que diferentes DTUs podem manifestar diferentes suscetibilidades a drogas, os novos candidatos quimioterápicos devem passar por avaliação contra a maior variabilidade de cepas

possíveis pertencentes à todas as DTU (MAGALHÃES et al., 2022; ZINGALES et al., 2014).

2.1.3 Metabolismo lipídico de *Trypanosoma cruzi*

Os lipídeos são elementos essenciais dos seres vivos, contribuindo na estruturação da membrana celular, como fonte de energia ou como moléculas de sinalização intracelular e extracelular. Em protozoários como *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp, essa biomolécula desempenha um papel fundamental nos estágios replicativos (BOOTH; SMITH, 2020; RAMAKRISHNAN et al., 2013).

A membrana das formas epimastigota de *T. cruzi* é composta por dois principais tipos de lipídeos (fosfolipídeos:35%, lipídeos neutros:65%). Há diversas vias para a síntese desses lipídeos, porém o parasito adaptou-se para ser capaz de obter algumas dessas biomoléculas diretamente do organismo hospedeiro (OLIVEIRA; TIMM; COSTA, 1977).

Booth e Smith (2020) relatam em seu trabalho que o avanço de análises genômicas permitiu uma melhor compreensão dessas vias metabólicas em *T. cruzi*, revelando diferenças significantes. Dentre as quais destaca-se a síntese de alguns lipídeos, como os esteróis. Desse modo, a biossíntese desse grupo torna-se um alvo quimioterápico interessante a ser investigado (MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

2.1.4 Metabolismo energético de *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida dos tripanossomatídeos de maior relevância para a medicina humana pode ser complexo, envolvendo mais de um estágio de desenvolvimento e a presença de outros organismos como hospedeiros, sendo eles o inseto vetor hematófago (hospedeiro invertebrado) que permite a propagação do microrganismo até outro animal (hospedeiro vertebrado). Devido às alterações impostas pelos diferentes ambientes ao longo do ciclo de vida, o parasito adaptou sua rede metabólica conforme os nutrientes disponíveis naquele meio. Por exemplo, em sua forma tripomastigota o *T. cruzi* utiliza a glicose, disponível em abundância nos fluidos de hospedeiros vertebrados. Porém, em sua forma epimastigota, o parasito passa a metabolizar aminoácidos, como a L-prolina, D-prolina e L-histidina, presentes dentro

do inseto vetor. Enquanto em sua forma replicativa intracelular (amastigota) no hospedeiro vertebrado, *T. cruzi* volta a fazer uso do metabolismo energético à base de glicose (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006).

Entre os produtos dessas reações metabólicas, encontra-se o nucleotídeo de elevada energia, Adenosina Trifosfato (ATP). Molécula necessária, por exemplo, para o funcionamento das bombas de prótons H^+ -ATPase, enzimas que desempenham importante papel na regulação da concentração de H^+ intracelular (VANDERHEYDEN; BENAÏM; DOCAMPO, 1996). O parasito apresenta dois diferentes tipos de H^+ -ATPase: o tipo vacuolar, presente na via endocítica, no interior da organela conhecida como acidocalcisomos, e na membrana plasmática das formas epimastigotas de *T. cruzi*; e o tipo P, que embora presente na membrana plasmática das formas epimastigotas, concentra-se na membrana da estrutura conhecida por reservossomos (VIEIRA et al., 2005).

Diante disso, os pesquisadores Michels e colaboradores (2021) realçam em seu trabalho que estruturas relacionadas e/ou dependentes do metabolismo de carboidratos do *T. cruzi* podem ser vistas como potenciais alvos quimioterápicos.

2.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana recebeu essa nomenclatura em homenagem ao médico e pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, quem descreveu o ciclo completo da doença, tendo identificado o agente vetor (triatomíneo), o agente etiológico (*T. cruzi*), suas manifestações e complicações em humanos em 1909 (CHAGAS, 1909).

Supõe-se que aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estejam acometidas por essa infecção no mundo, acometendo especialmente aqueles que se encontram em condições de maior vulnerabilidade social, e que são afetados diretamente pela carência de políticas públicas eficazes ao que diz respeito ao controle da DC, sobretudo no que tange à transmissão vetorial do agente etiológico *T. cruzi* (ALMEIDA et al., 2021).

Embora apresente maior predomínio na América Latina, sendo endêmica em 21 países; os casos de DC vêm ultrapassando as fronteiras continentais devido à evolução dos meios de transporte e o aumento do deslocamento da população mundial (WHO, 2020).

2.2.1 Transmissão

Como mencionado anteriormente, o maior número de indivíduos infectados encontra-se nos países da América Latina, majoritariamente em regiões com condições socioeconômicas e de habitação precárias e onde, naturalmente, há diversidade e quantidade de vetores capazes de transmitir *T. cruzi*, caracterizando, assim, como uma área endêmica para DC (ALVES, 2020; FONSECA, 2020).

Segundo Fidalgo e colaboradores (2018), a via clássica de transmissão do *T. cruzi* é por meio dos vetores (triatomíneos, habitualmente conhecidos por “barbeiros”), os quais se alimentam do sangue de um hospedeiro, e durante o repasto sanguíneo depositam seus dejetos contaminados pela forma tripomastigota metacíclica do parasito, que penetra no hospedeiro através de lesões pré-existentes na pele ou por meio das mucosas, dando início ao ciclo da infecção.

De acordo com Teixeira e colaboradores (2019), as características da moradia, bem como as medidas de saneamento, conservação e asseio empregadas pelos residentes, podem interferir na infestação do ambiente por triatomíneos. Os autores ainda informam que o desmatamento, por exemplo, é um fator antropogênico que favorece a migração do vetor e dos hospedeiros intermediários do *T. cruzi* para o ambiente urbano em busca de abrigo e alimento.

Até 2018, a ocorrência da transmissão vetorial era detectada em todos os estados do território brasileiro, sendo particularmente elevada na região Nordeste. Esse fato pode estar relacionado às condições de moradia e costumes dos inquilinos da região, a presença de grande quantidade de vetores na transmissão do agente etiológico da DC, em especial o *Triatoma brasiliensis*, o qual se adaptou bem a natureza urbana do local; e uma prática ainda ineficiente de uma política pública de fiscalização e controle entomológico (FIDALGO et al., 2018; SANTANA; SOUZA-SANTOS; ALMEIDA, 2018).

Outra possível forma de transmissão do agente etiológico da DC é a partir de transfusão sanguínea e/ou transplante de órgãos infectados. Entretanto, a infecção por meio dessa via depende de fatores como o material a ser doado, a carga parasitária na amostra biológica, assim como a cepa do parasito. Vale ressaltar que a propagação do parasito, nesses casos, tem sido controlada de forma rígida, por meio da análise das amostras a serem utilizadas, com o objetivo de verificar a presença de qualquer agente patógeno. Embora seja rara a chance de falha desses testes, uma

vez que apresentam uma sensibilidade acima de 95%, a transmissão de *T. cruzi* através da doação de sangue e órgãos pode vir a acontecer em países não endêmicos, pois os mesmos não realizam testes sorológicos para esse protozoário em sua rotina (BRITO, 2019; GUARNER, 2019).

Ademais, existem outras possibilidades de transmissão de *T. cruzi* como: a via vertical (congênita). A propagação da infecção por essa via pode ocorrer em qualquer momento da gestação, com chances maiores no último trimestre e no momento do parto, independente da fase da doença em que a mãe se encontre. Outra via de transmissão, mas essa é incomum, seria os casos referentes a acidentes laboratoriais ou manejo de animais infectados (ALMEIDA et al., 2021; BRITO, 2019).

A transmissão por via oral tem sido foco de atenção e preocupação, sendo inclusive a principal forma de transmissão em território nacional. A ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* é um indicativo de falhas no âmbito higiênico-sanitário, representando assim um grande risco de saúde pública (MATTOS et al., 2020).

Os primeiros relatos de transmissão do agente etiológico para humanos por transmissão oral constam da década de 60. Entretanto, para que essa via seja reconhecida como fonte primária do surto dessa doença é necessário que mais de uma pessoa apresente sintomas típicos da fase aguda da doença e que também tenha consumido o alimento investigado (NÓBREGA et al., 2009; SANTANA et al., 2019).

Na revisão de literatura conduzida por Pacheco e colaboradores (2021), foi observado que ao longo dos últimos 12 anos o Brasil desempenhou o papel de epicentro dos casos de transmissão oral de *T. cruzi* na América Latina.

2.2.2 Fases da doença

A cronologia das fases aguda e crônica pode variar conforme cada hospedeiro, embora seja comum perceber um intervalo de até 3 meses para a passagem da fase aguda para a crônica indeterminada; e o período para a manifestação, ou não, de alguma das formas clínicas é muito incerto, uma vez que diversas variáveis podem estar envolvidas no processo, mas estima-se uma média de 20 anos para o possível agravamento da forma assintomática da doença para a sintomática (OLIVEIRA, 2010).

A fase aguda da DC é caracterizada por uma parasitemia elevada, e em alguns casos, há presença de febre e manifestações clínicas nos locais de entrada do

parasito como o sinal de Romaña (figura 4). Complicações cardíacas nesta fase podem vir a acontecer, como miocardite, epicardite, endocardite aguda, e taquicardia. O sistema nervoso pode também ser acometido com o desenvolvimento da enfermidade, com degeneração neuronal intensa, enquanto o sistema digestivo pode ter injúrias leves. No entanto, a maioria dos casos permanecem assintomática nessa fase (DIAS; COURA, 1997b; FERREIRA et al., 2002; OLIVEIRA, 2010).

Figura 4 - Sinal de Romaña.



Nota: Criança com edema palpebral unilateral - sinal de Romaña. Fotografia de 1962, Panamá.

Fonte: Public Health Image Library (1962).

A fase crônica, por sua vez, é caracterizada pela parasitemia baixa e pelo alto número de anticorpos circulantes. Essa fase pode ser subdividida em diferentes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista ou neurológica (GARCIA, 2022). A forma indeterminada é marcada pelo elevado título de Imunoglobulina G (IgG) sérica e corresponde ao período assintomático ou com alterações cardíacas e digestivas leves (FERREIRA et al., 2002; OLIVEIRA, 2010; REY, 2001).

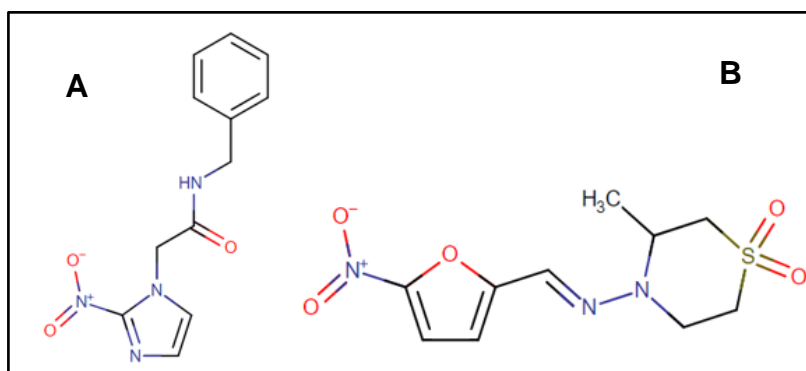
Na fase crônica cardíaca é comum apresentar miocardite crônica progressiva e/ou hipertrofia do coração (megacárdio), levando a quadros de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. Essa forma clínica é reconhecida como a de maior mortalidade na DC. Enquanto em sua fase crônica digestiva, a progressão da doença pode acarretar quadros de hipertrofia no esôfago (megaesôfago) e cólon intestinal (megacólon), manifestações que podem ser manifestadas através de sinais como disfagia, regurgitação e incoordenação motora (DIAS; COURA, 1997b; OLIVEIRA, 2010; RASSI JR; RASSI; RASSI, 2001).

A fase mista é descrita com presença de problemas de origem cardíaca e digestiva. E por fim, na forma neurológica, nota-se modificações relevantes no tecido nervoso central, que podem contribuir para o estabelecimento de quadros de meningoencefalite, principalmente em casos de imunossupressão (OLIVEIRA, 2010; ROCHA et al., 1994).

2.2.3 Tratamento

Embora a DC tenha sido descoberta há mais de um século, há apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento etiológico da infecção até o presente, sendo eles o benznidazol e o nifurtimox, apresentados na figura 5. Ambos são compostos nitro-heterocíclicos, sendo o nifurtimox um análogo do nitrofurano e o benznidazol um análogo nitroimidazólico. (ALEXANDRE; TESTON; JÚNIOR, 2014; GARCIA, 2022).

Figura 5 - Fórmula estrutural dos fármacos de escolha no tratamento da doença de Chagas.



Legenda: A) benznidazol e B) nifurtimox

Fonte: Drugbank (2022, 2023).

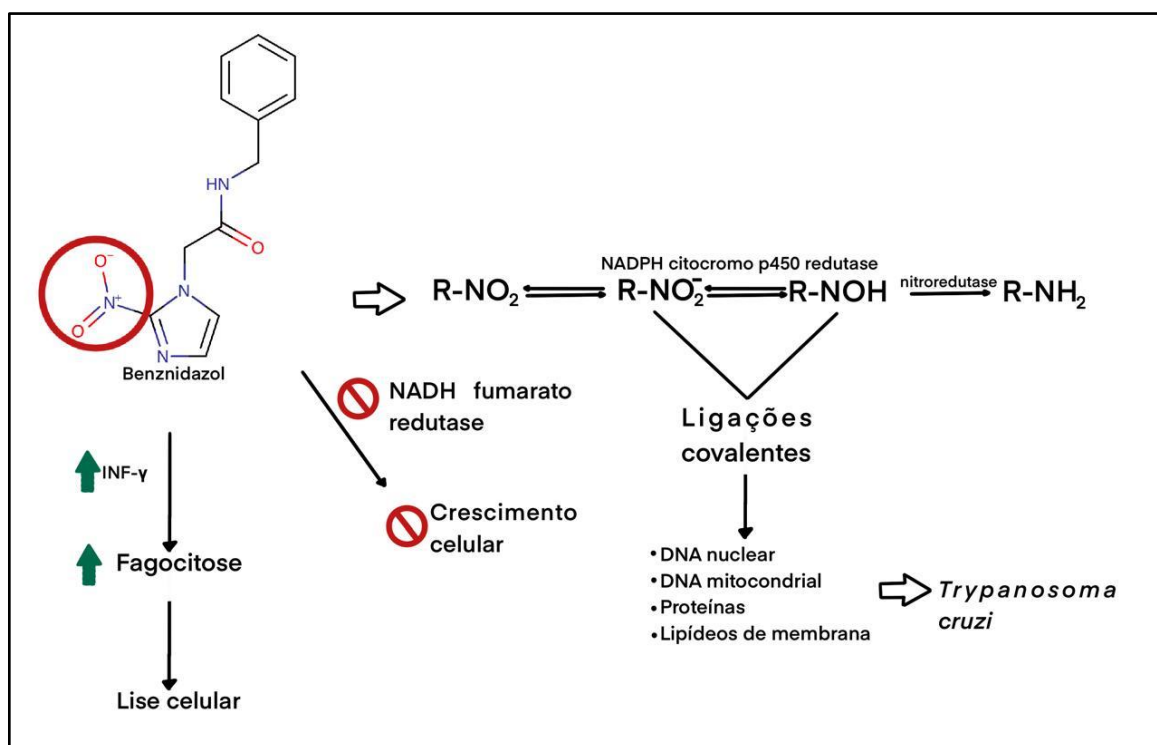
Ademais, os dois fármacos são tripanocidas contra as formas tripomastigotas (forma infectante de *T. cruzi*) e amastigota (forma replicativa de *T. cruzi* no hospedeiro infectado). No entanto, o índice de cura com esses fármacos varia muito conforme o estado do indivíduo tratado, a via de infecção, a fase da doença, a *Discrete Typing Units* (DTU) do parasito. Por exemplo, foi observado que durante a fase aguda o paciente apresenta maiores chances de cura (70 a 80%); contudo, na fase crônica constatou-se o inverso, chances reduzidas de cura (aproximadamente 10%), quando

então o tratamento envolve a atenuação dos sintomas (ALEXANDRE; TESTON; JÚNIOR, 2014).

Além disso, independentemente da escolha do medicamento usado, o tratamento apresenta efeitos adversos preocupantes, como dor muscular, tonturas, náuseas, até graves distúrbios da hematopoiese, ocasionando uma queda na adesão ao tratamento ou posterior interrupção do protocolo (ALEXANDRE; TESTON; JÚNIOR, 2014; DIAS et al., 2016).

Quanto ao mecanismo de ação, os dois fármacos são ativados por uma enzima mitocondrial (nitrorredutase) dependente de NADH, ocasionando a produção de radicais nitroaniônicos, sendo estes os verdadeiros agentes tripanocidas. A transferência de elétrons a partir do fármaco ativado regenera o nitrofurano nativo e gera radicais aniônicos superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio e a radical hidroxila (GARCIA, 2022). A reação desses radicais com macromoléculas celulares ocasiona lesões, tais como a degradação de lipídeos, dano da membrana, inutilização enzimática e agravos no DNA, como demonstrado pela figura 6.

Figura 6 - Possível mecanismo de ação do benznidazol.



Fonte: Davanço (2015).

Desde 1998, o Ministério da Saúde recomenda nifurtimox e o benznidazol como recurso terapêutico para pacientes com DC em determinadas circunstâncias, como: aqueles que se encontram na fase aguda ou indeterminada em casos pediátricos e adolescentes, em adultos e cardíacos assintomáticos, em pacientes imunocomprometidos e recém transplantados (ALEXANDRE; TESTON; JÚNIOR, 2014).

Diante das informações relatadas, destaca-se a relevância do desenvolvimento de novas drogas, assim como, o emprego de doses terapêuticas mais eficientes e menos tóxicas, e se possível, associação com outros fármacos para tratamento dos acometimentos cardíaco e digestivo.

2.3 Reposicionamento de fármacos

Apesar da questão sanitária, econômica e social referente a DC, os medicamentos em uso, descobertos há mais de 40 anos, apresentam reduzida eficácia na fase crônica da doença e provocam sérios problemas devido a sua toxicidade (WHO, 2022).

Embora exista esforços de inúmeros grupos de pesquisa, a evolução no sentido de se desenvolver fármacos mais efetivos e menos tóxicos ainda não foi alcançada, devido a isso a DC ainda desempenha o papel de doença parasitária responsável pelo maior número de mortes na América Latina, superando a malária (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Considerando os efeitos adversos e o surgimento de resistência quanto as terapias existentes para essa infecção, existe a preocupação de se descobrir novos medicamentos rapidamente. Entretanto, sabe-se que esse processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos envolve muitas etapas, sendo um processo longo e oneroso. Quanto a esse aspecto, existe falta de interesse da indústria farmacêutica e de recursos financeiros para o tratamento das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (IDO, 2019; SILVA et al., 2021).

Diante desse contexto, o reposicionamento de fármacos torna-se atrativo. Esta estratégia procura encontrar novas aplicações para medicamentos já aprovados que fogem da recomendação médica original. Quando comparada a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos, esse recurso fornece algumas vantagens, como por exemplo, a redução do tempo de produção e a segurança no uso do medicamento,

uma vez que os perfis farmacocinético e farmacodinâmico já se encontram esclarecidos (PUSHPAKOM et al., 2019).

O alicerce teórico do reposicionamento de fármacos consiste no avanço das técnicas de biologia molecular, e conseqüentemente, uma melhor compreensão genética das doenças e no conceito de fármacos pleiotrópicos, ou seja, aqueles que apresentam mais de um efeito biológico. Em relação ao primeiro ponto, a melhora no entendimento do genoma humano e de organismos patogênicos associados as técnicas *in silico* permitiram determinar o nível de semelhança molecular entre enfermidades e entre medicamentos, permitindo assim explorar a possibilidade do emprego de um mesmo fármaco apresentar efeito em patologias distintas (JOURDAN et al., 2020).

Para exemplificar o uso e o sucesso da estratégia de reposicionamento de fármacos, a figura 7 exhibe um quadro com os fármacos que passaram por esse processo e encontraram usos distintos do planejado inicialmente.

Figura 7 - Fármacos avaliados em processo de reposicionamento.

Nome da Droga	Indicação Original	Reposicionamento	Data da Aprovação
Ácido acetilsalicílico (Hoffman, 1887)	Analgésico	Antiagregante plaquetário	1980
Fumarato de Dimetila (Schweckendiek, 1959)	Fungicida em objetos como móveis e sapatos	Psoríase; Esclerose múltipla recidivante	1994; 2013
Sildenafil (Pfizer, 1996)	Angina	Disfunção erétil	1998
Talidomida (Kunz, 1953)	Enjoo matinal	Eritema nodoso hansênico; Mieloma múltiplo	1998; 2006

Fonte: Elaborado pelo autor com base em Jourdan e colaboradores (2020).

Segundo Urbina (2001, 2002), estudos realizados na Venezuela e no Brasil revelaram que fármacos inibidores da biossíntese de esteróis, usuais no tratamento de micoses, apresentaram potencial ação anti-chagásica *in vitro*.

Iniciou-se então a síntese de novos compostos com similaridade estrutural com estes já estudados. Dentre eles, foram desenvolvidos derivados do triazol, como o posaconazol, o qual mostrou potencial para o tratamento da DC com efeito antiparasitário tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos animais (SOBRINHO et al., 2007).

No estudo conduzido por Gupta e colaboradores (2022), os pesquisadores investigaram possível ação dos fármacos posaconazol e lansoprazol contra amastigotas de *Leishmania donovani*, causador da leishmaniose visceral. Ainda nesse estudo, os autores propuseram que o possível mecanismo de ação do posaconazol seria sobre a enzima lanosterol 14 - α desmetilase, enquanto do lansoprazol as ATPases transportadoras de cálcio.

Como demonstrado pelos exemplos citados anteriormente, algumas particularidades das vias metabólicas do parasito podem servir como importantes alvos terapêuticos para o uso da técnica de reposicionamento de fármacos.

2.3.1 Análises *in silico*

O termo *in silico* sugere “simulação computacional” para o enfrentamento de problemas e/ou experimentos biológicos (KAR et al., 2020). O uso dessa metodologia tornou-se mais frequente na área científica, atuando em diferentes segmentos em estudos na fase pré-clínica, como estudos de toxicidade, análise da atividade farmacológica, mecanismo de ação, entre outros. Dependendo do tipo de pesquisa a ser executada e seus objetivos, a análise *in silico* dispõe de recursos que variam de alto grau tecnológico, como computadores com *softwares* avançados e bases de dados complexas (COSTA, 2022; MILLER et al., 2021) a bancos de dados online e gratuitos, com capacidade de encurtar etapas antes necessárias para análises *in vitro* (MAGARINOS et al., 2012).

Na área de doenças negligenciadas, existem bancos de dados online e gratuitos que fornecem informações que podem auxiliar na investigação de novos alvos quimioterápicos no parasito como alternativa para o tratamento da DC por

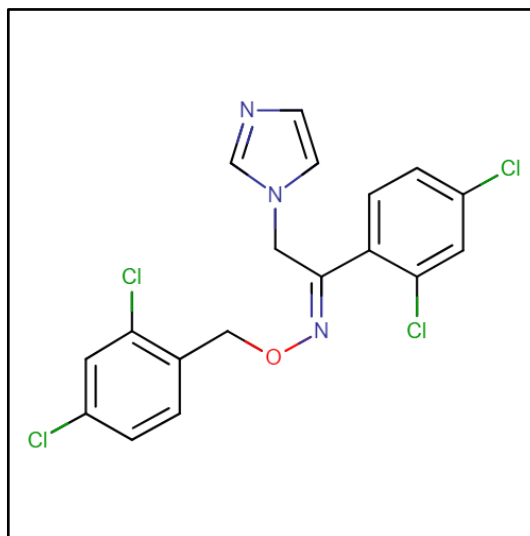
exemplo, como o *TDR Targets*, *TriTrypDB*, *DrugBank* e *Therapeutic Target Bases*. Os dois primeiros bancos de dados armazenam dados voltados ao genoma de patógenos que causam doenças, como *T. cruzi*, *L. major*, *Plasmodium falciparum*; os outros programas citados atuam como acervos de conhecimento direcionados a drogas e seus mecanismos de ação. Desse modo auxiliando na estratégia de reposicionamento de fármacos ao fornecer informações sobre os alvos terapêuticos proteicos e genéticos já explorados de doenças, assim como as vias e medicamentos correspondentes a cada uma dessas estruturas (ASLETT et al., 2010; MAGARINOS et al., 2012; WANG; GUAN, 2021; WISHART et al., 2008, 2018)

Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem utilizado uma estratégia baseada no conhecimento disponível a respeito dos dados genômicos do protozoário para identificar fármacos já aprovados com potencial atividade tripanocida. A partir de análises *in silico* e de ensaios *in vitro* foi possível selecionar fármacos com atividade biológica sobre as formas replicativas (epimastigotas) do parasito para serem o objeto de estudo desta pesquisa. Com base em nossas análises, pôde-se verificar que os dois fármacos selecionados (nitrito de oxiconazol e lansoprazol) possuem elevada afinidade com as enzimas lanosterol-sintase, putativa e H⁺-ATPase do tipo P, putativa, pertencentes ao metabolismo lipídico e energético, respectivamente (GARCIA, 2022).

2.3.2 Nitrito de oxiconazol

O nitrito de oxiconazol (figura 8) é um fármaco pertencente a classe dos éteres de oxima, derivado do imidazol, logo um antifúngico azólico com ação fungicida ou fungistática *in vitro* contra fungos patógenos, dermatites e leveduras, utilizado para tratar infecções cutâneas, sendo comercializado na forma de creme (CHOI; PODUST; ROUSH, 2014; DRUGBANK, 2021a; KOSMALSKI et al., 2023).

Figura 8 - Fórmula estrutural do nitrato de oxiconazol.



Fonte: Drugbank (2021a).

Pertencente aos azóis (grupo de antifúngicos), a principal característica é o bloqueio da biossíntese de ergosterol, componente essencial da membrana de fungos e protozoários. Seu mecanismo de ação constitui em desestabilizar a enzima CYP51 (esterol 14 α -desmetilase), do citocromo P450, de modo que não ocorra a produção de ergosterol (BUCKNER; URBINA, 2012; VERMA et al., 2011).

Em *T. cruzi*, a inibição de ergosterol provocaria a não formação de membranas viáveis, conseqüentemente, o não desenvolvimento do parasito. O imidazol, que está presente no nitrato de oxiconazol, se liga ao grupo heme da enzima CYP51, afetando a ligação e causando a catálise do substrato, que assim, inibe a enzima (BELTRAN-HORTELANO et al., 2022).

Cerca de 50 anos que antifúngicos têm sido estudados e testados como forma de tratamento para DC (BUCKNER; URBINA, 2012), tendo destaque os fármacos fluconazol, cetoconazol e posaconazol, sendo este o com melhor resultado em modelo animal infectado com *T. cruzi* (CHOI; PODUST; ROUSH, 2014). Dessa forma, o nitrato de oxiconazol tem potencial para ser uma escolha viável no tratamento da doença, por ser inibidor de CYP51; embora não exista relatos de experimentos com esse fármaco na literatura.

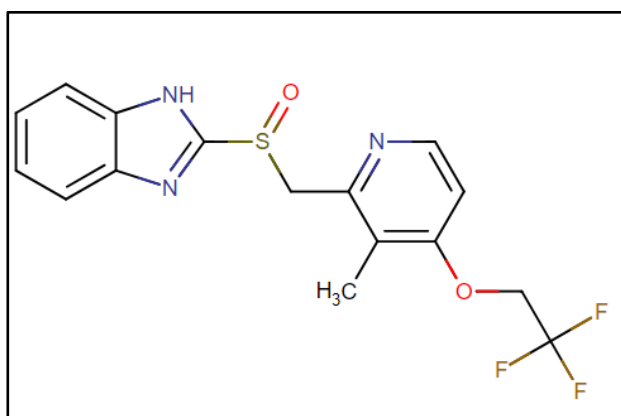
Além disso, nenhum dos azóis antifúngicos inibidores de CYP51 estudados, inibem a CYP51 dos humanos, que produz o colesterol (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018). Em casos raros, o nitrato de oxiconazol pode contribuir para a

permeabilidade da membrana de zinco, de modo que eleve sua citotoxicidade (DRUGBANK, 2021a).

2.3.3 Lansoprazol

Lansoprazol (figura 9) é um inibidor da bomba de prótons e é estruturalmente classificado como um benzimidazol. Ele reduz a secreção de ácido gástrico ao direcionar as bombas gástricas de H,K-ATPase e, portanto, é eficaz na promoção da cura em doenças ulcerativas, e tratar a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) juntamente com outras patologias causadas pela secreção ácida excessiva (DRUGBANK, 2021b).

Figura 9 - Fórmula estrutural do lansoprazol.



Fonte: Drugbank (2021b).

Realizaram-se estudos testando a toxicidade deste fármaco com medicamentos quimioterápicos, e os resultados apontaram um efeito inibitório competitivo maior quando comparado a outros inibidores de bomba de prótons (IKEMURA et al., 2016). Quanto a sua toxicidade, os relatos mais frequentes tratam-se de dor abdominal, constipação, diarreia e náusea (DRUGBANK, 2021b).

Quanto aos tripanossomatídeos, o lansoprazol demonstrou resultados positivos na inibição do desenvolvimento de leishmaniose *in vitro* devido a sua capacidade de se ligar as ATPases de transporte de cálcio que atuam na membrana do retículo endoplasmático de *L. donovani*, essenciais a sua sobrevivência (GUPTA et al., 2022). Entretanto, não encontramos relatos na literatura de ensaios realizados entre esse fármaco e o modelo biológico *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a ação de fármacos selecionados *in silico*, nitrato de oxiconazol e lansoprazol, sobre alvos funcionais em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a replicação de formas epimastigotas tratadas com a Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) dos fármacos selecionados.

Avaliar o efeito das Concentrações Inibitórias (CI₅₀) dos fármacos selecionados sobre tamanho e complexidade celular.

Avaliar o efeito das Concentrações Inibitórias (CI₅₀) dos fármacos selecionados sobre a integridade de membrana plasmática.

Avaliar o efeito das Concentrações Inibitórias (CI₅₀) dos fármacos selecionados sobre o ciclo celular.

Avaliar o efeito das Concentrações Inibitórias (CI₅₀) dos fármacos selecionados sobre o potencial de membrana mitocondrial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental, desenvolvida com ensaios *in vitro*, utilizando uma população clonal de *Trypanosoma cruzi* (DTU I) 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. O material de origem foi cedido pelo pesquisador responsável pelo banco de microrganismos, Dr. Stenio Perdigão Fragoso, do Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná.

4.2 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (CONTRERAS et al., 1985) foram mantidas em cultura a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques periódicos a cada 3 dias. Para os experimentos foram utilizados parasitas em fase exponencial de crescimento (CAMARGO, 1964).

4.3 Equipamentos e reagentes utilizados

Dentre os equipamentos utilizados para a execução deste trabalho estão a capela de fluxo laminar (ESCO Class II BSC), microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), câmara de Neubauer, Estufa com Demanda Bioquímica de Oxigênio (Incubadora B.O.D. MA 415 – Marconi), centrífuga de eppendorf (MiniSpin), termobloco (Accu Block™ Digital Dry Bath - Labnet), vórtex (Vortex Mixer – Labnet), espectrofotômetro (Asys Expert Plus – Biochrom), citômetro de fluxo contínuo (FACS Canto II Becton-Dickinson - San Jose, CA, USA).

Quanto aos reagentes, foram utilizados o 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen®), água destilada, benznidazol (Sigma-Aldrich 419656®), dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth®), Iodeto de Propídeo (IP)(Sigma-Aldrich P4170®), lansoprazol

(Sigma-Aldrich L8533[®]), *Liver Infusion Tryptose* (LIT), nitrato de Oxiconazol (Sigma-Aldrich SML1474[®]), Rhodamina 123 (Rh123)(Sigma-Aldrich R8004[®]), *Phosphate-buffered saline* (PBS).

4.4 Fármacos selecionados para estudo

Com base em resultados obtidos recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (GARCIA, 2022), foram selecionados dois fármacos com potencial atividade sobre *T. cruzi*, o nitrato de oxiconazol e lansoprazol. Nesse estudo anterior, por meio de análises *in silico*, foram utilizadas as bases de dados *online* e gratuitas *TDR Targets* (MAGARINOS et al., 2012), *TriTrypDB* (ASLETT et al., 2010), *DrugBank* e *Therapeutic Target Bases* (WISHART et al., 2008) para 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.

4.5 Determinação de CI₅₀/24h

Os fármacos selecionados *in silico*, nitrato de oxiconazol e lansoprazol, juntamente com o benznidazol foram incubados em triplicatas em diferentes concentrações por 24 horas, como demonstrada pela figura 10.

Os fármacos foram solubilizados em DMSO e as maiores concentrações foram determinadas de forma a garantir que não houvesse mais de 1% desse reagente nas amostras. Os demais valores foram alcançados a partir do processo de diluição seriada em PBS.

Figura 10 - Concentrações de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol testadas em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Fármaco	Concentrações Testadas (µM)
Nitrato de Oxiconazol	583; 291; 146; 105; 72
Lansoprazol	541; 406; 271; 135; 68
Benznidazol	40; 20; 10

A densidade celular utilizada foi de 1×10^7 parasitos/mL, com o objetivo de garantir a sensibilidade do ensaio analisado sob um período de 24 horas (DE ALMEIDA et al., 2021).

Para controle de viabilidade desse experimento optou-se por utilizar o parasito tratado com PBS1x, sob as mesmas condições das demais amostras. Após 24h, foi realizada a contagem dos parasitos viáveis de cada réplica, em câmara de Neubauer.

Com base nos dados das contagens foram calculadas as porcentagens de viabilidade (PV) para cada concentração testada dos fármacos, no *software* Microsoft Excel 2020, de acordo com Anjos (2014).

Os valores de PV obtidos, através da fórmula representada pela figura 11, representam o percentual de viabilidade e foram empregados para determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀/24h), por análise de regressão não linear, no *software* GraphPadPrism 7,04.

Figura 11 - Fórmula para determinar Porcentagem de Viabilidade (PV).

$$PV: \frac{\text{Parasitos viáveis na concentração testada} \times 100}{\text{Parasito viáveis no controle}}$$

4.6 Avaliação da replicação

Para este e os demais ensaios, padronizou-se o uso da concentração de 1×10^6 parasitos/mL, de acordo com De Almeida e colaboradores (2021).

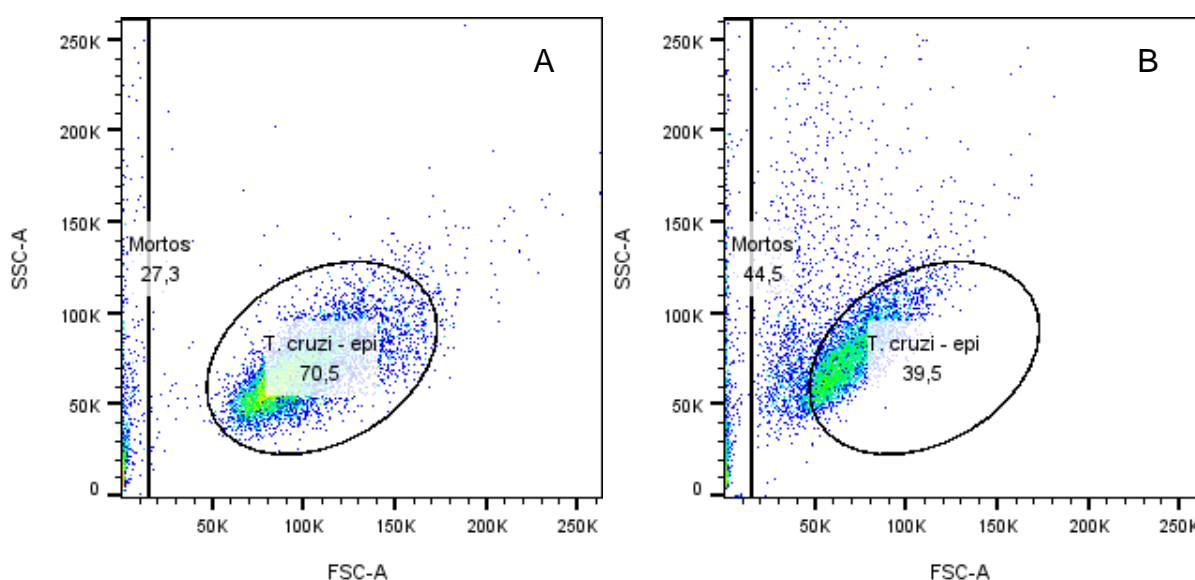
Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com a CI₅₀/24h dos três fármacos foram analisados. Como controle de replicação foram cultivados parasitos na presença PBS1x na mesma densidade celular do que aqueles cultivados na presença dos compostos. O experimento mantido a 28°C durante o período de análise. Ao longo de cinco dias (120 horas), o crescimento dos parasitos foi monitorado a cada 24 h por meio de contagem na câmara de Neubauer. A curva e os valores de desvio padrão foram estabelecidos utilizando Microsoft Office Excel 2020, de acordo com Silva (2023).

4.7 Avaliação do tamanho e complexidade celular

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratados durante 24h com a CI_{50} dos fármacos estudados. Após o período de incubação, os parasitos foram centrifugados a 3000g/10min, lavados com PBS1x, e posteriormente analisados no FACS Canto II Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA). Padronizamos este e os demais ensaios para a aquisição de 10.000 eventos nos *gates* previamente estabelecidas como correspondentes às formas epimastigota de *T. cruzi* (Dm28c), para avaliação do tamanho (*forward scatter* - FSC) e complexidade (*side scatter* -SSC) das células tratadas em relação ao controle não tratado (PIRES, 2007).

Como estratégia de *gate* deste ensaio foram utilizados parasitos tratados somente com PBS1x (controle não tratado) e parasitos incubados a 60 °C durante 15 min (controle de lise), como demonstrado pela figura 12. Associado a essa metodologia, foi utilizada microscopia óptica em campo claro para observação da morfologia dos parasitos tratados com as CI_{50} dos fármacos testados.

Figura 12 - Estratégia experimental para definição da região correspondente a epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, utilizada nos ensaios de citometria de fluxo.



Legenda: A - Parasitos tratados com PBS1X (controle não tratado); B – Parasitos incubados a 60°C durante 15 min (controle de lise).

4.8 Análise da integridade da membrana plasmática

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas durante 24h com a CI₅₀ dos fármacos selecionados para este projeto. Após o período de incubação, os parasitos foram centrifugados a 3000g/10min, lavados com PBS1x e incubados com o 7- AAD por 15 minutos a 28 °C. Os parasitos foram analisados no FACS Canto II Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA) com aquisição de 10.000 eventos, nas regiões previamente estabelecidas como correspondentes às epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c), como descrito na figura 12 A. O 7-AAD é um fluoróforo capaz de penetrar somente em células cuja membrana plasmática esteja alterada, portanto é utilizado em ensaios de avaliação da integridade de membrana. Parasitos incubados a 60 °C durante 15 minutos foram utilizados como controle de marcação e parasitas tratados somente com PBS1x como controle não marcado. (LAZARIN - BIDOIA, 2015; SCHMID et al., 1992).

4.9 Avaliação do ciclo celular

Formas epimastigotas dos parasitos foram incubadas por 24 h em meio LIT na presença da CI₅₀ dos fármacos estudados. Após o período de incubação os parasitos foram centrifugados a 3.000g/10min, lavados com PBS1x, e marcados através da adição do IP. Imediatamente, foram analisados em citômetro de fluxo FACS Canto II Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA), com a aquisição de 10.000 eventos. Parasitos tratados com PBS1x e marcados com IP foram usados como controle negativo de marcação. (BATISTA et al., 2018).

4.10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Formas epimastigotas previamente tratados por 24h com a CI₅₀ dos fármacos analisados foram centrifugados 3.000g/10min e lavados com PBS1x. Os parasitas foram incubados por 15 min a 28 °C com 10 µg/mL de Rhd 123 e então, lavados 3 vezes em PBS1x. Foram coletados 10.000 eventos na região correspondente à epimastigota em citômetro FACSCanto II, conforme figura 12 A. Parasitos incubados a 60 °C por 15 minutos e marcados com Rhd 123 por 15 min a 28 °C foram utilizados

como controle de marcação e parasitas tratados somente com PBS1x como controle não marcado. (LAZARIN - BIDOIA, 2015).

4.11 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Foram determinados a média e o desvio padrão para cada dado obtido em cada experimento independente e as análises estatísticas das diferenças entre o percentual de viabilidade dos parasitos foram comparadas entre os tempos, para cada fármaco, pela análise de variância (ANOVA), modelo univariado (uma via), com *post test* de Tukey. Os valores de *p* iguais ou menores que 0,05 foram considerados significantes. As concentrações capazes de inibir 50% da viabilidade dos parasitas (CI50) foram obtidas por meio de análise de regressão não linear entre os valores percentuais de inibição/morte frente à concentração (*log*) de cada fármaco. As análises dos dados foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico *GraphPadPrism* (San Diego, CA, EUA). Os dados da citometria foram analisados utilizando-se o *software* FACSDIVA e *software* FlowJo (Treestar software).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação de CI₅₀/24h

As concentrações testadas de cada fármaco e o valor de viabilidade celular obtidos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Viabilidade celular de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em relação às concentrações testadas de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol.

Fármaco	Concentração Testada (μM)	Viabilidade Celular (%)
Nitrato de oxiconazol	582,58	0
	291,29	0,49
	145,64	63,14
	104,86	90,91
	72,24	100
Lansoprazol	541,47	56,91
	406,10	59,65
	270,74	81,19
	135,37	85,37
	67,68	100,00
Benznidazol	40	59,41
	20	77,31
	10	86,61

Foi observado maior viabilidade celular até nas maiores concentrações testadas de lansoprazol.

Na tabela 2 podemos observar as CI_{50} dos fármacos testadas sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Tabela 2 - CI_{50} de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* durante 24h.

Fármaco	$CI_{50}(\mu M)$	R^2	Intervalo de Confiança
Nitrato de oxiconazol	158,42	0,9957	153,20 a 163,82
Lansoprazol	226,74	0,9157	189,89 a 270,71
Benznidazol	16,99	0,9288	13,99 a 20,60

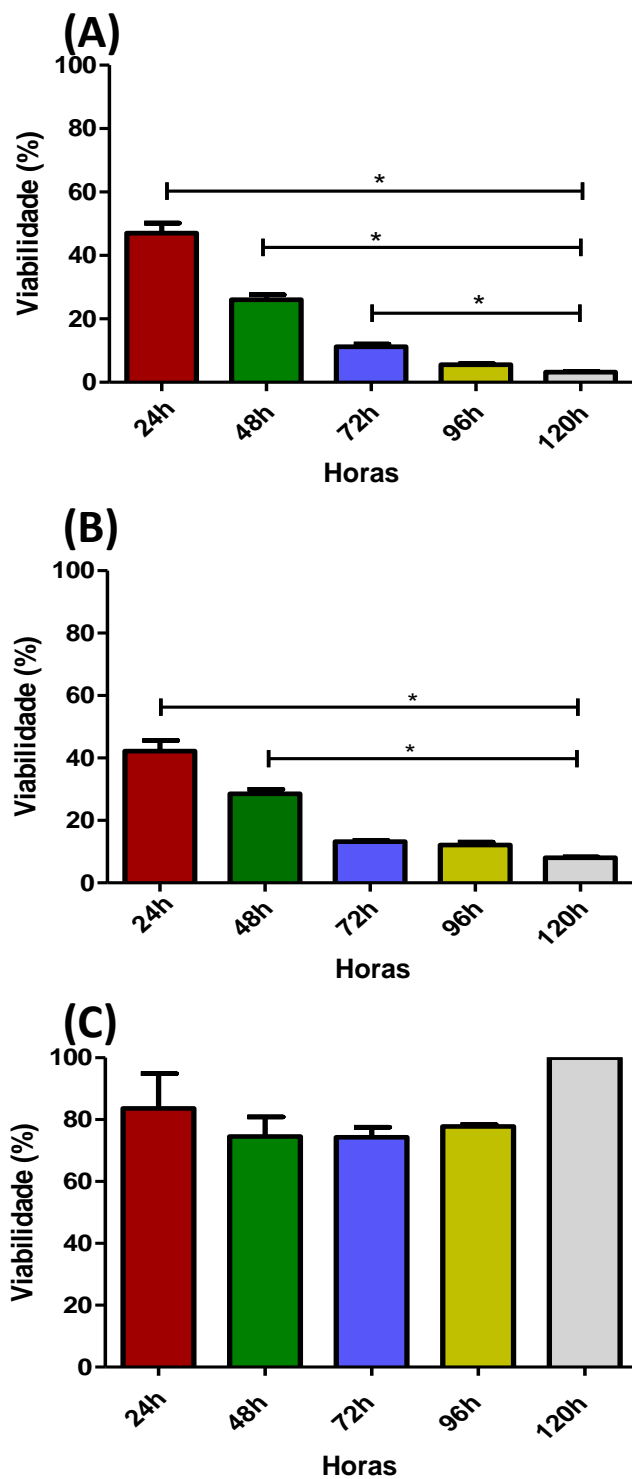
Legenda: CI_{50} - Concentração Inibitória para 50% dos parasitos testados; R^2 - Coeficiente de determinação.

5.2 Avaliação da replicação

Na figura 13 observamos a porcentagem de viabilidade de epimastigotas tratadas com CI_{50} dos fármacos estudados por 120h.

Como demonstrado na figura 13, o fármaco nitrato de oxiconazol apresentou uma porcentagem de viabilidade semelhante ao do fármaco referência no tratamento da doença, o benznidazol. Alcançando seu ápice de inibição após 96h de tratamento. A densidade celular dos parasitos tratados com lansoprazol se apresentou igual à do controle.

Figura 13 - Efeito do tempo sobre a viabilidade (%) de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com a $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, benznidazol e lansoprazol.



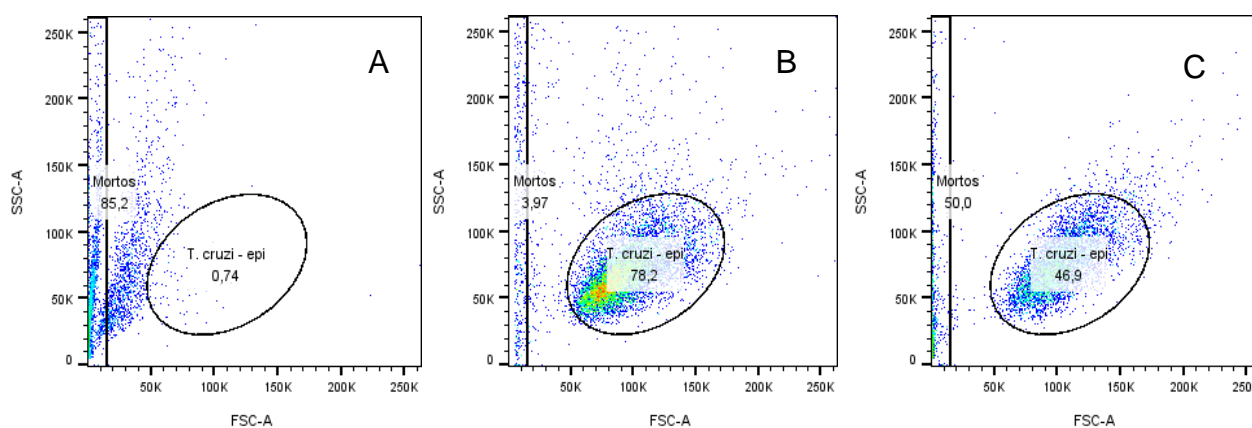
Legenda: A - Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol; B – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de benznidazol (fármaco de referência); C – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de lansoprazol.

* indica diferença ($p < 0,05$) entre tempos.

5.3 Avaliação do tamanho e complexidade

Na figura 14 foi observado o efeito do tratamento com a CI50 do nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por análise de citometria de fluxo da Complexidade (SSC) x Tamanho (FSC) de epimastigotas de *T. cruzi*. Vale ressaltar que o nitrato de oxiconazol (figura 14 A) alterou o tamanho e complexidade celular da maioria dos parasitos; enquanto que a maioria dos parasitos tratados com lansoprazol (figura 14 B) não sofreram alterações. O tratamento com benznidazol (figura 14 C) resultou em alterações em cerca de 50% de parasitos.

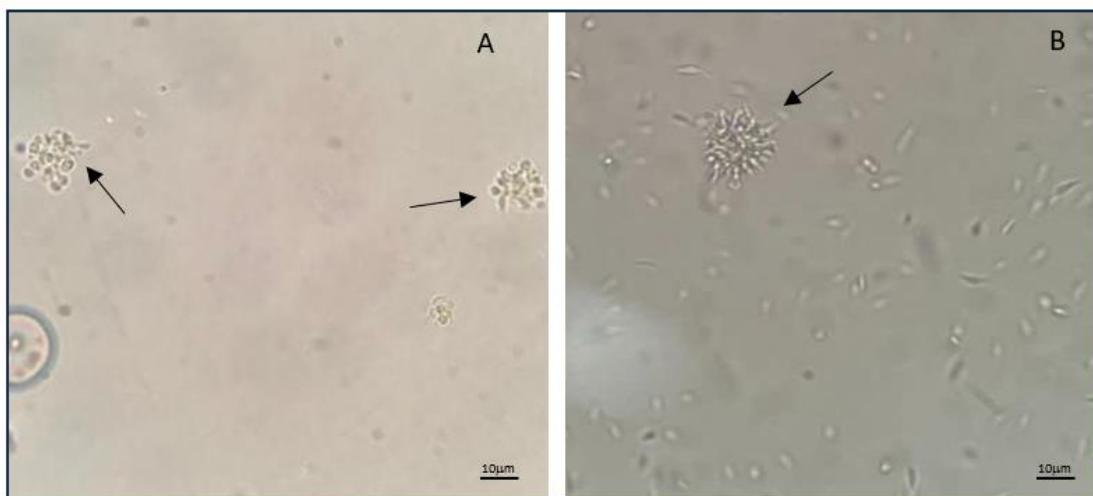
Figura 14 - Análise da Complexidade (SSC) x Tamanho (FSC) de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com CI₅₀/24h de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por citometria de fluxo.



Legenda: A - Parasitos tratados com CI₅₀/24h de nitrato de oxiconazol; B – Parasitos tratados com CI₅₀/24h de lansoprazol; C – Parasitos tratados com CI₅₀/24h de benznidazol (fármaco de referência).

Na avaliação microscópica dos parasitos tratados com a CI50 de nitrato de oxiconazol (figura 15 A) por 24h, foi possível observar a presença de debris celulares do parasito. O tratamento com lansoprazol (figura 15 B), por sua vez, provocou alterações como a presença de parasitos menores e o aumento de estruturas características da alta taxa de replicação celular do parasito, as rosetas.

Figura 15 - Morfologia de formas epimastigotas tratadas com C150/24h de nitrato de oxiconazol e lansoprazol.

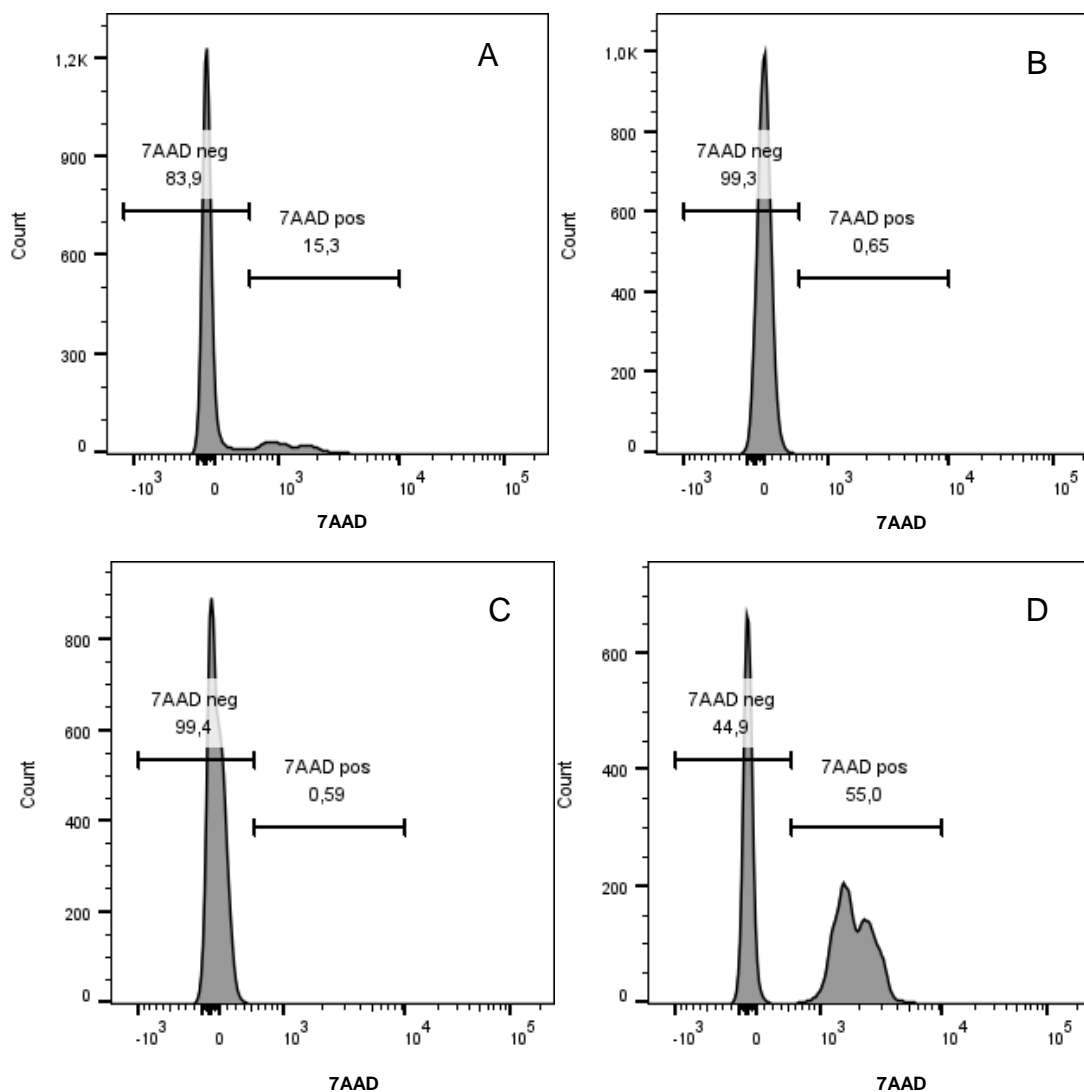


Legenda: Figura A – parasitos tratados com C150/24h de nitrato de oxiconazol, as setas demonstram a presença de debris celulares; Figura B – parasitos tratados com C150/24h de lansoprazol, a seta indica estrutura celular associada a alta taxa de replicação (Roseta). Microscopia óptica de campo claro, aumento de 400x.

5.4 Avaliação da integridade da membrana plasmática

A figura 16 demonstra a integridade da membrana plasmática de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com os diferentes fármacos. O fármaco nitrato de oxiconazol (figura 16 A) apresentou capacidade de afetar a integridade da membrana celular de 15,3% parasitos, aumentando assim sua permeabilidade. O mesmo não pode ser dito das amostras tratadas com lansoprazol (figura 16 B) e benznidazol (figura 16 C). Na figura 16 D, pode ser observado o comportamento de parasitos submetidos a incubação a 60 °C por 15 minutos (controle de marcação).

Figura 16 - Análise da integridade da membrana citoplasmática de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por citometria de fluxo.

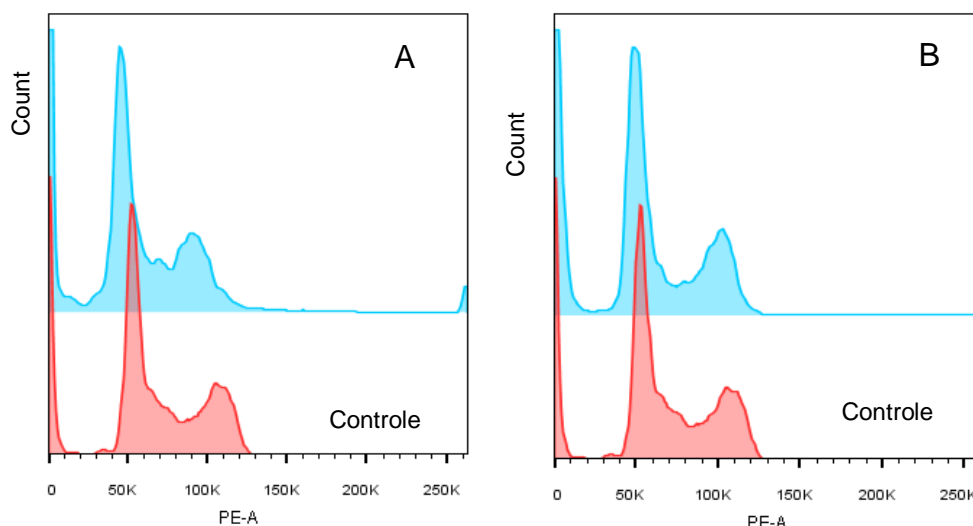


Legenda: A – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol; B – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de lansoprazol; C – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de benznidazol (fármaco de referência); D – Parasitos incubados a 60 °C durante 15 min (controle de marcação). 7AAD neg - região de baixa fluorescência, indicando que o fluoróforo não penetrou na célula, compatível com a manutenção da integridade da membrana plasmática; 7AAD pos - região de alta fluorescência, indicando que o fluoróforo foi capaz de penetrar na célula, portanto indicando a alteração da permeabilidade da membrana.

5.5 Avaliação do ciclo celular

Observou-se que o fármaco nitrato de oxiconazol (figura 17 A) foi capaz de interferir no ciclo celular do parasito, em razão da diminuição da amplitude da curva que representa a fase S no gráfico. Como esperado, o benznidazol (figura 17 B) não apresentou efeito nesse ensaio. No entanto, os parasitos tratados com lansoprazol não apresentaram leitura quando analisado sob as mesmas condições que as demais amostras.

Figura 17 - Análise do ciclo celular de formas de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol e benznidazol por citometria de fluxo.



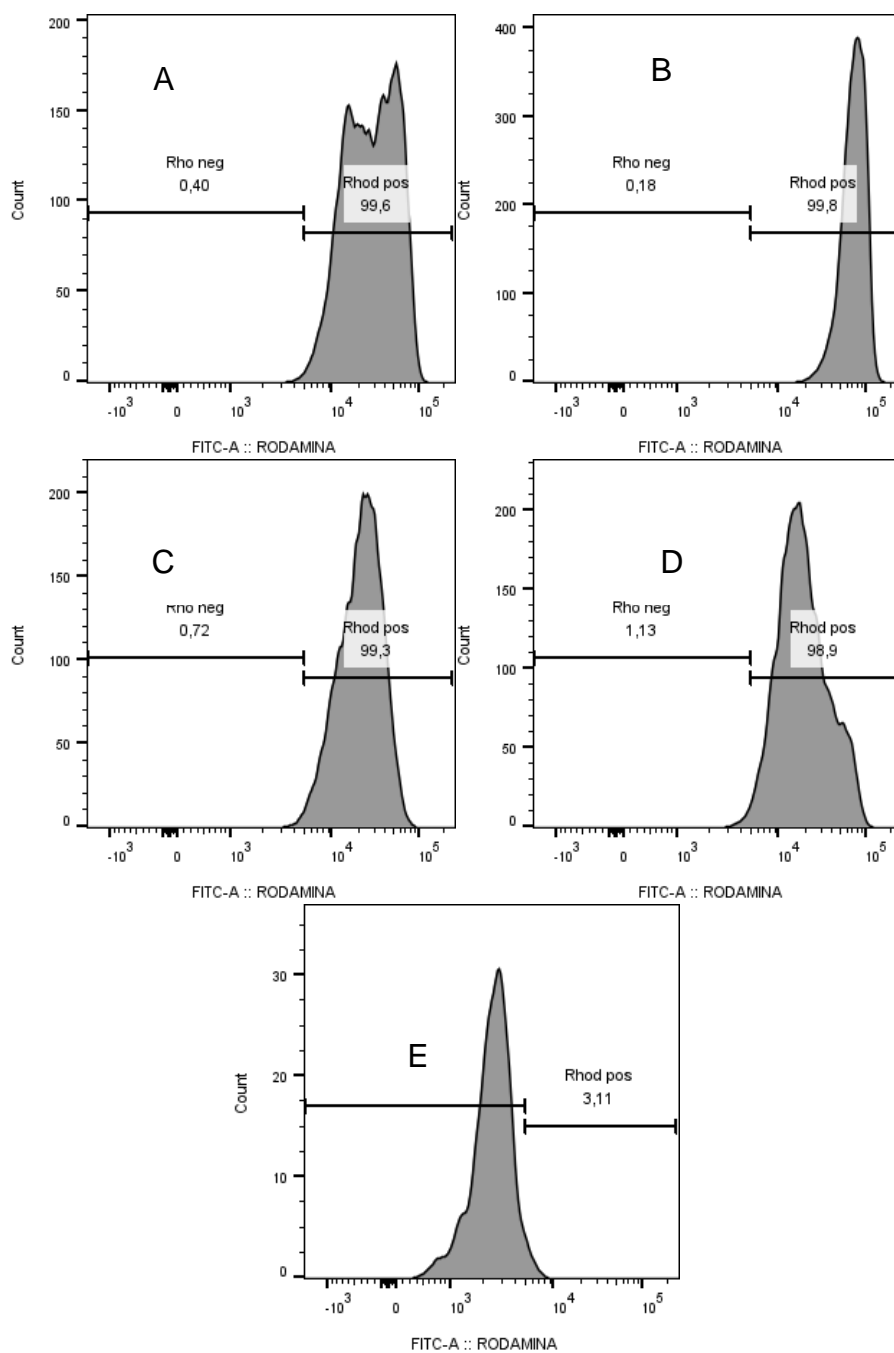
Legenda: A – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol (parte superior) / Amostra controle (parte inferior); B – Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de benznidazol (parte superior) / Amostra controle (parte inferior)

5.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Na figura 18, pode-se observar a análise por citometria de fluxo do potencial de membrana mitocondrial de formas epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com a $CI_{50}/24h$ dos fármacos analisados. Os parasitos tratados com nitrato de oxiconazol (figura 18 A), lansoprazol (figura 18 B) e benznidazol (figura 18 C) não demonstraram despolarização em sua membrana mitocondrial, visto que apresentaram alta fluorescência nas análises, assim como o controle não marcado (figura 18 D). A figura

18 E, por sua vez, indica a despolarização da membrana mitocondrial dos parasitos após lise térmica.

Figura 18 - Análise do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol, lansoprazol e benznidazol por citometria de fluxo.



Legenda: A - Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de nitrato de oxiconazol; B - Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de lansoprazol; C - Parasitos tratados com $CI_{50}/24h$ de benznidazol (fármaco de referência); D - Parasitos tratados com PBS1X (controle não marcado); E - Parasitos tratados com PBS1x após lise por temperatura (controle de marcação). Rhod neg - região de baixa fluorescência indicando a despolarização mitocondrial; Rhod pos - região de alta fluorescência indicando a não despolarização mitocondrial.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o fármaco nitrato de oxiconazol se mostrou mais ativo sobre os alvos funcionais investigados em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c), em comparação com o fármaco lansoprazol, especialmente ao que se refere às análises de integridade de membrana plasmática, replicação, ciclo celular, complexidade e tamanho celular. Os valores de CI50 encontradas para os fármacos testados foram maiores do que os obtidos para o fármaco de referência, benznidazol.

Entre os alvos quimioterápicos interessantes para o tratamento da doença de Chagas, encontra-se a família de proteínas conhecida por Citocromo P450(CYP). Dentro desse grupo de proteínas, existe a enzima 14 α -desmetilase (CYP51), a qual pode estar presente em uma grande diversidade de organismos, desempenhando um papel fundamental na biossíntese de esterol (HAINES, 2001; YOSHIDA et al., 2000). Em relação a *T. cruzi*, o microrganismo apresenta-se inteiramente dependente de esteróis produzidos endogenamente para a formação de sua membrana citoplasmática, ao mesmo tempo em que demonstra incapacidade de fazer uso do colesterol do hospedeiro (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011).

Na revisão publicada por Lepesheva e colaboradores (2011), os autores expõem a ideia de que os inibidores da CYP51 afetam de forma clara a rota de síntese de esterol do parasito, comprometendo de forma grave a organização ultra estrutural de sua membrana, especialmente na forma intracelular do *T. cruzi*, a amastigota.

No entanto, no trabalho conduzido por Dumoulin e colaboradores (2022), os pesquisadores demonstraram que o gene que codifica a 14 α -desmetilase o complexo CYP51 pode ser interrompido (nockout genético) nas formas epimastigotas do parasito sem ocasionar a perda total de viabilidade, mostrando sua não essencialidade. No entanto, os parasitos mutantes apresentaram redução na taxa de multiplicação, quando comparado ao parasito selvagem (não mutante).

Em análises *in silico* anteriores, resultados indicaram que o nitrato de oxiconazol teria ação sobre a enzima CYP51 (GARCIA, 2022). Sendo assim, os resultados do presente trabalho demonstram que o fármaco foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade de membrana, ao mesmo tempo em que reduziu a capacidade de multiplicação do microrganismo.

Em organismos da família Trypanosomatidae os esteróis sintetizados pelo seu metabolismo, bem como enzimas atuantes nesse processo, encontram-se presentes não apenas nas membranas plasmáticas do microrganismo, mas também nas membranas do glicossomos e mitocôndrias, indicando uma possível colaboração dessas organelas na rota de biossíntese do esterol do parasito (PEÑA-DIAZ et al., 2004; QUIÑONES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2001). No trabalho elaborado por Dumoulin e colaboradores (2022), os dados sugerem que a falta da enzima esterol 14 α -desmetilase esteja envolvida na disfunção mitocondrial. Entretanto, as análises realizadas neste trabalho não indicaram interferência pelo nitrato de oxiconazol no potencial de membrana mitocondrial.

Lepesheva e colaboradores (2011) comentam em sua pesquisa que existem duas características que devem ser levadas em consideração na procura por medicamentos específicos frente a uma rota metabólica ou uma enzima específica: a via tratada deve ser fundamental ao organismo patogênico, e/ou sua enzima deve possibilitar o desenho de fármacos capazes de inibi-la de forma eficiente.

Com base em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (GARCIA, 2022), o outro alvo quimioterápico analisado foi H^+ -ATPases do tipo P. As H^+ -ATPases do tipo P constituem uma grande família de proteínas responsáveis por bombear íons e lipídeos através de membranas plasmáticas. Esta família em particular tem como característica a formação de um composto intermediário fosforilado (+Pi) durante a reação de hidrólise da ATP em ADP, assim caracterizando como do tipo P (JUSTESEN et al., 2013).

Originalmente, essas estruturas foram associadas exclusivamente a plantas e fungos, desempenhando uma função bombeadora de prótons na membrana plasmática, resultando no controle de pH e de potencial elétrico. Porém, em trabalhos anteriores com *T. cruzi* havia sido relatado que o processo de homeostase do pH intracelular dependia de estruturas que exercessem tal função, como por exemplo os transportadores transmembranas de prótons. A análise dos genes ligados a essas estruturas conduziram a H^+ -ATPases do tipo P com homologia as ATPases presentes em células vegetais e fúngicas (JUSTESEN et al., 2013; LUO; SCOTT; DOCAMPO, 2002).

Enquanto a presença e a atividade dessas estruturas em plantas e leveduras foram descritas na membrana plasmática e no retículo endoplasmático; resultados de análises bioquímicas indicaram a presença de H^+ -ATPases do tipo P intracelular em

T. cruzi, mais especificamente em uma estrutura conhecida como reservossomos. Trata-se de grandes organelas encontradas na extremidade posterior do parasito que exercem uma função de estocar recursos necessários para a etapa de diferenciação (metaciclogênese) do microrganismo, passagem da sua forma epimastigota para tripomastigota, justificando assim a diminuição dessa estrutura em sua última forma ((BOCKELMANN; LISS; WEILER, 1998; DE SOUZA, 2002; FERREIRA; MASON; SLAYMAN, 2001; SCOTT; DOCAMPO, 2000; VIEIRA et al., 2005).

O conhecimento acerca da constituição proteica dos reservossomos ainda se encontra muito limitado, porém estudos relatam inicialmente a presença de duas isoformas de H⁺ - ATPases do tipo P (TcHA1 e TcHA2), como responsáveis pelo caráter ácido dessa organela. A TcHA1 estaria localizada na membrana plasmática da forma epimastigota e nos reservossomos, e a forma TcHA2 apenas nos reservossomos (VIEIRA et al., 2005). No entanto, análises proteômicas realizadas por Sant'Anna e colaboradores (2009) identificaram uma nova isoforma, TcHA3, presente também nas membranas dos reservossomos.

Embora a literatura careça de estudos a respeito da análise das H⁺ - ATPases do tipo P em *T. cruzi* como possíveis alvos quimioterápicos, e tomando como base os resultados obtidos, acreditamos que o lansoprazol possa ter uma ação mais localizada no TcHA2 e/ou TcHA3 presentes nos reservossomos, justificando assim os resultados negativos em nossas análises de replicação, ciclo celular, integridade de membrana e potencial de membrana.

Ademais, os fármacos analisados neste estudo não apresentaram registros na literatura de sua atividade anti-*T. cruzi* (Dm28c), indicando que nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a realizar essa associação.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que o fármaco nitrato de oxiconazol apresentou-se mais ativo, atuando sobre mais de um alvo funcional quando comparado ao lansoprazol, principalmente quanto a replicação, integridade de membrana plasmática, tamanho e complexidade e ciclo celular. Com relação ao potencial de membrana mitocondrial, o nitrato de oxiconazol não apresentou efeito neste ensaio. Por fim, quanto ao lansoprazol, concluímos que o fármaco não afetou os alvos funcionais investigados.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A solução de lansoprazol utilizada para o experimento apresentava Dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente capaz de interferir na viabilidade do parasito quando em concentrações superiores a 1%. Esse motivo impossibilitou a testagem de concentrações maiores desse fármaco.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante do exposto, vislumbramos a possibilidade de realizar experimentos voltados à investigação do efeito de lansoprazol sobre os reservossomos. Quanto ao nitrato de oxiconazol, acreditamos que análises com a forma replicativa amastigota seja uma possibilidade interessante a ser estudada

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALEXANDRE, J. P. D. O.; TESTON, A. P. M.; JÚNIOR, G. Z. Tratamento etiológico da doença de Chagas: um antigo problema de saúde pública. **Uningá Review**, v. 20, n. 2, 10 nov. 2014.

ALMEIDA, A. M. V. DE et al. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e de transmissão / Chagas disease: Epidemiological, physiopathological and transmission aspects. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 18931–18944, 3 set. 2021.

ALVES, N. S. G. D. **Influência da infecção por *Trypanosoma cruzi* sobre a microbiota intestinal no hospedeiro mamífero**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Brasília: Universidade de Brasília, 20 mar. 2020.

American Trypanosomiasis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 19 mar. 2024.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 27–35, 1997.

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 95–111, ago. 2014.

ANJOS, D. O. **Avaliação do efeito do derivado de β -lapachona R72 em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi* *in vitro***. Tese de Doutorado—Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.: Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, ago. 2004.
ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D457-462, jan. 2010.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D457-462, jan. 2010.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. **Fisiologia – Portal da Doença de Chagas**. , 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/vetor/fisiologia/>>. Acesso em: 22 jul. 2023
BARRADELL, L. B.; FAULDS, D.; MCTAVISH, D. Lansoprazole. **Drugs**, v. 44, n. 2, p. 225–250, 1 ago. 1992.

BATISTA, C. M. et al. Treatment of *Trypanosoma cruzi* with 2-bromopalmitate alters morphology, endocytosis, differentiation and infectivity. **BMC cell biology**, v. 19, n. 1, p. 19, 31 ago. 2018.

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

BOCKELMANN, C.; LISS, H.; WEILER, E. W. Evidence for a functional p-type H⁺-atpase at the rough endoplasmic reticulum of *Bryonia dioica* jacq. Tendrils. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 194–198, 1 jan. 1998.

BOOTH, L.-A.; SMITH, T. K. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A review. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 240, p. 111324, nov. 2020.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, 1 set. 2006.

BRITO, J. DA DA S. Doença de Chagas: aspectos fisiopatológicos e históricos. **Revista Atenas Higeia**, v. 1, n. 2, p. 54–60, 17 out. 2019.

BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Including Articles from Keystone Symposium on “Drug Discovery for Protozoan Parasites”; pp. 230–270. v. 2, p. 236–242, 1 dez. 2012.

CAMARGO, E. P. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 6, p. 93–100, 1964.

CARVALHO, T. U. D.; SOUZA, W.; VIDAL, J. **Organização Estrutural – Portal da Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

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

CHOI, J. Y.; PODUST, L. M.; ROUSH, W. R. Drug Strategies Targeting CYP51 in Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11242–11271, 26 nov. 2014.

CLARK, C. G.; PUNG, O. J. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 175–179, jul. 1994.

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

COSTA, M. F. **Análise dos métodos *in silico* frente à estudo *in vivo*: Uma revisão integrativa**. Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia—Macaé: UFRJ, 2022.

DAVANÇO, M. **Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)—Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Campus de Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho - UNICAMP, 16 out. 2015.

DE ALMEIDA, J. M. et al. Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isoobtusilactone A in short exposure of time. **PloS One**, v. 16, n. 1, p. e0245882, 2021.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269–285, 2002.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (EDS.). *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Em: **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997a. p. 486.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 1997b.

DIAS, J. V. L. et al. Conhecimentos sobre triatomíneos e sobre a doença de Chagas em localidades com diferentes níveis de infestação vetorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 7, p. 2293–2304, jul. 2016.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444–2457, 2009.

DRUGBANK. **Oxiconazole**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00239>>. Acesso em: 1 abr. 2023a.

DRUGBANK. **Lansoprazole**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00448>>. Acesso em: 1 abr. 2023b.

DRUGBANK. **Benznidazole**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB11989>>. Acesso em: 10 maio. 2024.

DRUGBANK. **Nifurtimox**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB11820>>. Acesso em: 10 maio. 2024.

DUMOULIN, P. C. et al. Endogenous Sterol Synthesis Is Dispensable for *Trypanosoma cruzi* Epimastigote Growth but Not Stress Tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 937910, 17 jun. 2022.

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 377–387, ago. 2014.

FERREIRA, M. S. et al. Doença de Chagas. Em: **Tratado de infectologia: v.2**. [s.l.: s.n.]. p. 1195–1233, 2002.

FERREIRA, T.; MASON, A. B.; SLAYMAN, C. W. The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 32, p. 29613–29616, 10 ago. 2001.

FIDALGO, A. S. O. DE B. V. et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174–182, abr. 2018.

FONSECA, G. A. **Fisiopatologia e diagnóstico das principais hemoparasitoses causadoras de infecção em humanos**. Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Biomedicina—Brasília: Centro Universitário de Brasília - UniCEUB, 2020.

FRANCO, J. et al. ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benznidazole resistance: gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 31, p. 198–208, abr. 2015.

FREITAS, J. M. et al. **Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi* | PLOS Pathogens**. 2006. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0020024>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

GARCIA, C. S. **Estudo de reposicionamento de fármacos com potencial atividade contra enzimas do metabolismo de *Trypanosoma cruzi***. Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq—Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, 2022.

GAUNT, M. W. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936–939, 27 fev. 2003.

GRUENDLING, A. P. et al. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p. 1178–1189, jun. 2015.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, maio 2019.

GUPTA, Y. 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**, v. 30, n. 1, p. 128–149, 15 mar. 2022.

HAINES, T. H. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 4, p. 299–324, jul. 2001.

HERRERA, C. et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 535–539, jul. 2007.

IDO, V. H. P. Transparência no setor farmacêutico: uma nova dimensão do debate internacional sobre acesso a medicamentos? **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 17, n. 3, 2019.

IKEMURA, K. et al. Lansoprazole Exacerbates Pemetrexed-Mediated Hematologic Toxicity by Competitive Inhibition of Renal Basolateral Human Organic Anion Transporter 3. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 44, n. 10, p. 1543–1549, out. 2016.

JOURDAN, J.-P. et al. Drug repositioning: a brief overview. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145–1151, set. 2020.

JUSTESEN, B. H. et al. Active Plasma Membrane P-type H⁺-ATPase Reconstituted into Nanodiscs Is a Monomer. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26419–26429, 13 set. 2013.

KAR, S. et al. Ecotoxicological assessment of pharmaceuticals and personal care products using predictive toxicology approaches. **Green Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1458–1516, 9 mar. 2020.

KAWASHITA, S. Y. et al. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 12, p. 2250–2259, dez. 2001.

KOSMALSKI, T. et al. A Review of Biologically Active Oxime Ethers. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 5041, jan. 2023.

LAZARIN - BIDOIA, D. **Avaliação do mecanismo de ação *in vitro* e dos efeitos biológicos *in vivo* induzido pelas Dibenzilidenoacetona A3K2A1 e A3K2A1 em *Trypanosoma cruzi***. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós

Graduação em Ciências Farmacêuticas—Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2015.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1820–1836, dez. 2018.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). **Advances in parasitology**, v. 75, p. 65–87, 2011.

LUO, S.; SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* H⁺-ATPase 1 (TcHA1) and 2 (TcHA2) genes complement yeast mutants defective in H⁺ pumps and encode plasma membrane P-type H⁺-ATPases with different enzymatic properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44497–44506, 15 nov. 2002.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7396–7401, 19 jun. 2001.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human-host interactions. **The Lancet. Microbe**, v. 3, n. 9, p. e711–e722, set. 2022.

MAGARINOS, M. P. et al. TDR Targets: a chemogenomics resource for neglected diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D1118–D1127, 1 jan. 2012.

MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641–655, maio 2009.

MATTOS, E. C. D. et al. Fragment detection of Coleopteran and Triatomine insects in experimentally contaminated acai pulp and sugarcane juice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20190119, 2020.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 374–392, 16 ago. 2012.

MICHELS, P. A. M. et al. Carbohydrate metabolism in trypanosomatids: New insights revealing novel complexity, diversity and species-unique features. **Experimental Parasitology**, v. 224, p. 108102, 1 maio 2021.

MILES, M. A. et al. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217–225, 1977.

MILES, M. A. et al. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, n. 5656, p. 819–821, 27 abr. 1978.

MILES, M. A. et al. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8234, p. 1338–1340, 20 jun. 1981.

MILES, M. A. et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1509–1528, out. 2009.

MILLER, C. et al. *In silico* trials for treatment of acute ischemic stroke: Design and implementation. **Computers in Biology and Medicine**, v. 137, p. 104802, out. 2021.

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

NÓBREGA, A. A. et al. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, abr. 2009.

OLIVEIRA, L. S. **Modelando a interação entre o sistema imunológico humano e o *Tripanossoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada)—Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010.

OLIVEIRA, M. M.; TIMM, S. L.; COSTA, S. C. Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 195–199, 1977.

OSORIO-MÉNDEZ, J. F.; CEVALLOS, A. M. Discovery and Genetic Validation of Chemotherapeutic Targets for Chagas' Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 439, 7 jan. 2019.

PACHECO, L. V. et al. Transmissão oral da doença de Chagas: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e31910212636–e31910212636, 17 fev. 2021.

PEÑA-DÍAZ, J. et al. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 3, p. 1356–1363, mar. 2004.

PINTO, C. M. et al. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1328–1332, ago. 2012.

PIRES, S. DA F. **Geração e caracterização de linhagens de *Trypanosoma cruzi* expressando proteínas fluorescentes como ferramentas para pesquisa em Doença de Chagas.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 18 out. 2007.

Atualizações de citação automática estão desativadas. Para ver a bibliografia, clique em Atualizar na aba do Zotero.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, jan. 2019.

QUIÑONES, W. et al. The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. **Experimental Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 135–149, 1 mar. 2004.

RAMAKRISHNAN, S. et al. Lipid synthesis in protozoan parasites: A comparison between kinetoplastids and apicomplexans. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 488–512, 1 out. 2013.

RASSI JR, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. SciELO - Brazil -. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, p. 86–96, jan. 2001.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Em: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.** [s.l: s.n.]. p. 856–856. 2001.

ROCHA, A. et al. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 261–268, mar. 1994.

RODRIGUES, C. O. et al. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 588–594, 2001.

ROMANHA, A. J. et al. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 139–142, 1979.

SANTANA, M. P.; SOUZA-SANTOS, R.; ALMEIDA, A. S. DE. Prevalência da doença de Chagas entre doadores de sangue do Estado do Piauí, Brasil, no período de 2004 a 2013. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. e00123716, 19 fev. 2018.

SANTANA, R. A. G. et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 132–135, jan. 2019.

SANT'ANNA, C. et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1782–1794, abr. 2009.

SANTOS, C. G. S. DOS. **Caracterização molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* isolada na zona urbana da cidade de Salvador/Ba.** Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)—Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

SCHMID, I. et al. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 2, p. 204–208, 1992.

SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 24215–24221, 4 ago. 2000.

SHIN, J. M.; SACHS, G. Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. **Current gastroenterology reports**, v. 10, n. 6, p. 528–534, dez. 2008.

SILVA, A. B. D. **O efeito de Dissulfetos de Diarila sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi***. Mestrado—Campo Grande: Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2023.

SILVA, A. P. DA et al. Doenças negligenciadas e indústria farmacêutica: o caso da Doença de Chagas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e21110212419–e21110212419, 10 fev. 2021.

SILVA, G. H. **Moléculas envolvidas na invasão de células de mamíferos por *Trypanosoma cruzi*: uma revisão de literatura**. Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Ciências Biológicas -Licenciatura—Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

SOBRINHO, J. L. S. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 103–118, 28 set. 2007.

SOUTO, R. P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 141–152, 20 dez. 1996.

SOUZA, W.; VIDAL, J.; ZINGALES, B. **Taxonomia Morfológica - Portal da Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/taxonomia/>>. Acesso em: 17 out. 2023.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749, 28 ago. 2012.

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

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, v. 7, n. 9, p. 228–232, set. 1991.

TOMASINI, N.; DIOSQUE, P. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 403–413, 24 mar. 2015.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 733–741, dez. 2001.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 287–295, 2002.

VANDERHEYDEN, N.; BENAÏM, G.; DOCAMPO, R. The role of a H(+)-ATPase in the regulation of cytoplasmic pH in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochemical Journal**, v. 318, n. Pt 1, p. 103–109, 15 ago. 1996.

VERMA, A. et al. Antileishmanial activity of benzocycloalkyl azole oximino ethers: The conformationally constraint analogues of oxiconazole. **Acta Tropica**, v. 117, n. 2, p. 157–160, 1 fev. 2011.

VIEIRA, M. et al. Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 392, n. Pt 3, p. 467–474, 15 dez. 2005.

WANG, X.; GUAN, Y. COVID-19 drug repurposing: A review of computational screening methods, clinical trials, and protein interaction assays. **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 1, p. 5–28, jan. 2021.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**.2020. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>>. Acesso em: 15 abr. 2023.

WHO. **Chagas disease**. 2022. 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: 15 abr. 2023.

WISHART, D. S. et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D901–906, jan. 2008.

WISHART, D. S. et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1074–D1082, 4 jan. 2018.

YOSHIDA, Y. et al. Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p. 799–804, 14 jul. 2000.

YUN, O. et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year

experience of Médecins Sans Frontières. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 7, p. e488, 7 jul. 2009.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

ZINGALES, B. et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828–833, set. 2014.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, Recent Advances in Genetic and Molecular Diagnosis of Parasitic Protozoa. v. 184, p. 38–52, 1 ago. 2018.

ZUMA, A. A.; DOS SANTOS BARRIAS, E.; DE SOUZA, W. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 14, p. 1671–1732, 2021.