

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

DANIEL CAMILO FONSECA CAVALCANTI

**POTENCIAL ATIVIDADE DOS FÁRMACOS OXICONAZOL E LANSOPRAZOL
SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* Dm28c**

**CAMPO GRANDE – MS
2023**

DANIEL CAMILO FONSECA CAVALCANTI

**POTENCIAL ATIVIDADE DOS FÁRMACOS OXICONAZOL E LANSOPRAZOL
SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* Dm28c**

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

Orientadora: Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira

DANIEL CAMILO FONSECA CAVALCANTI

**POTENCIAL ATIVIDADE DOS FÁRMACOS OXICONAZOL E LANSOPRAZOL
SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* Dm28c**

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

Campo Grande, MS, _____ de _____ de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira – UFMS

Prof^a. Dra. Inês Aparecida Tozetti – UFMS

Prof^a. Dra. Thalita Bachelli Riul - UFMS

Prof^a. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda (Suplente) – UFMS

Prof^a. Dra. Eliane Mattos Piranda (Suplente) – UFMS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele eu não conseguiria chegar até aqui.

Ao meu pai André Camilo, e meus avós, Antonia e Edson, muito obrigado por todo suporte e por acreditarem em mim e por sempre me apoiarem.

À minha incrível orientadora, professora Alda, só tenho a agradecer, muito obrigado por tudo, por acreditar em mim, em confiar, me orientar e principalmente por me aturar (missão mais difícil) em momentos em que o pânico esteve presente! Muito obrigado!

À jovem Jenni, amiga desde o início da graduação e para vida toda, muito obrigado por todo puxão de orelha, pelos incentivos, amizade, por sempre me ouvir e **principalmente** por ter feito a ponte com a prof Alda. E ao Alex, amigo que fiz durante a graduação e que compõe parte do trio The nine, junto comigo e com a Jenni.

Aos meus primos, Mayara, David, André (namorado da May, e grande amigo) e aos meus tios, Dona Mara e Davi, muito obrigado por me aturarem por ouvirem eu falando de mestrado sempre, e principalmente por me aturarem **TODOS** os finais de semana (e as vezes durante a semana), já que não saio daí, ninguém mandou morar perto!!

Aos meus primos, Vanessa, Marília e Jones. Aos meus tios, tias, primos e primas da grande família Camilo e Fonseca, muito obrigado por todo suporte!

Agradeço imensamente às profs do LabImunoBio, Inês e Cacilda, por sempre estarem presentes, ajudando e aconselhando, muito obrigado!! Agradeço também à prof Luana e ao prof Sebastião! Também agradeço à Carla, nossa incrível técnica e amiga, obrigado por tudo!! Aos irmãos, a família é grande, do *GT. cruzi* por toda parceria,

amizade, fofoca, suporte e troca de experiências! Obrigado, vocês são incríveis. Aqui destaco a parceria e amizade dos usuários do fluxo (grupo secreto): Bruna e Anny, por terem me ensinado toda a dinâmica do lab quando cheguei, e ao Carlos, que iniciou a jornada assim que eu entrei, e por ser parceiro durante esses dois anos.

Agradeço também aos estagiários que tive, Aryanne, Eduarda e Will, vocês foram fundamentais nessa jornada, obrigado por cada câmara de Neubauer que vocês lavaram enquanto eu contava parasitos! E agradeço imensamente ao meu estagiário e amigo Pedro, por me apoiar, auxiliar e estar presente durante as rotinas do lab, experimentos e processo de escrita!

Também agradeço a incrível equipe do Laboratório de Parasitologia Humana, local que fui estagiário durante minha graduação, e que durante esses dois anos de mestrado disponibilizaram o micro invertido para que eu pudesse cuidar das Vero. Obrigado pela parceria. Aqui destaco e agradeço também a Amarith, doutoranda que acompanhei durante minha graduação e que ficou feliz quando contei que iria fazer mestrado com a prof Alda!

Agradeço aos amigos que fiz durante o mestrado, e integrantes do “ Fofoca? Não, esquistossomose”: Wess, Ana, Gui e Jud, além da Jenni e Carlos. À toda equipe, professores e alunos do PPGDIP, obrigado!

À CAPES pela bolsa de mestrado, à FUNDECT e à UFMS.

E a todos que me acompanharam durante minha jornada, **OBRIGADO!**

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Classificada como uma Doença Tropical Negligenciada e endêmica da América Latina, acredita-se que até 7 milhões de pessoas estejam infectadas. Os tratamentos disponíveis para essa doença são pouco eficientes na fase crônica, além de apresentarem efeitos adversos. O processo de descoberta de novos fármacos é longo e de alto custo, sendo assim estratégias de reposicionamento de fármacos vem ganhando destaque, pois possibilita a redução de custos e período até sua disponibilização para uso. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de dois fármacos, selecionados previamente *in silico*, sobre formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* Dm28c. Foram realizados ensaios de citotoxicidade com os fármacos Oxiconazol (OXI) e Lansoprazol (LZP) frente às células Vero e em formas tripomastigotas metacíclicas, obtidas *in vitro*, sob condições quimicamente definidas com o objetivo de determinar a concentração capaz de inibir 50% da viabilidade dos parasitos. Posteriormente, foram realizados ensaios para avaliar a influência dos fármacos sobre o processo de metaciclogênese *in vitro*. Com os dados obtidos de CC₅₀ (concentração citotóxica de 50%) e CI₅₀ (concentração inibitória de 50%) foi calculado o IS (Índice de Seletividade). O OXI apresentou efeito citotóxico com CC₅₀ de 45,11 µM, ao contrário do LZP que não apresentou citotoxicidade. O OXI teve efeito sobre formas tripomastigotas, com CI₅₀ de 279,6 µM de 0,16, já o LZP teve um IS de 2,46 e com menor atividade contra o parasito. Ambos os fármacos foram ativos sobre o processo de diferenciação, onde formas intermediárias estiveram mais presentes que as tripomastigotas metacíclicas, revelando que desde o período de deflagração da diferenciação os fármacos afetaram o processo, impedindo ou retardando a finalização do mesmo. Sendo assim, os dois fármacos apresentaram efeito durante a metaciclogênese, contudo, apenas o OXI apresentou atividade contra as formas tripomastigotas metacíclicas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *In silico*; Kinetoplastida; Metaciclogênese; Reposicionamento de fármacos;

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is classified as a neglected tropical disease and is endemic in Latin America, where up to 7 million people are believed to be infected. The available treatments for this disease are not very effective in the chronic phase and also have adverse effects. The process of discovering new drugs is long and expensive, so drug repositioning strategies are gaining ground as they can reduce costs and time to market. The aim of this study was to evaluate the activity of two drugs, previously selected *in silico*, on metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* Dm28c. Cytotoxicity tests were performed with the drugs oxiconazole (OXI) and lansoprazole (LZP) against Vero cells and metacyclic trypomastigote forms obtained *in vitro*, under chemically defined conditions, with the aim of determining the concentration capable of inhibiting 50% of parasite viability. Subsequently, tests were performed to evaluate the influence of the drugs on the process of metacyclogenesis *in vitro*. Using the CC₅₀ (50% cytotoxic concentration) and IC₅₀ (50% inhibitory concentration) data, the SI (selectivity index) was calculated. OXI showed a cytotoxic effect with a CC₅₀ of 45.11 μ M, in contrast to LZP which showed no cytotoxicity. OXI had an effect on trypomastigote forms with an IC₅₀ of 279.6 μ M and an SI of 0.16, while LZP had an SI of 2.46 and less activity against the parasite. Both drugs had an effect on the differentiation process, where intermediate forms were more abundant than metacyclic trypomastigotes, indicating that the drugs affected the process from the onset of differentiation, preventing or delaying its completion. Thus, both drugs had an effect during metacyclogenesis, but only OXI acted against the metacyclic trypomastigote forms.

Keywords: Chagas Disease; Drug repositioning, *In silico*; Kinetoplastida; Metacyclogenesis;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1 - Formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2 - Formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 3 - Formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 5 - Reconstrução tridimensional das etapas da metaciclogênese de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 6 - Via do Mevalonato em <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 7 - Formas tripomastigotas metacíclicas e intermediárias de <i>Trypanosoma cruzi</i> presentes nos tratamentos com OXI e LZP em relação ao controle.	40
Figura 8 - Média e Desvio padrão de formas intermediárias e tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> expostos à CI_{50} de OXI.	41
Figura 9 - Média e Desvio padrão de formas intermediárias e tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> expostos à CI_{50} de LZP.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Citotóxica de 50% dos fármacos sobre células Vero.	38
Tabela 2 - Concentração Inibitória de 50% de OXI e LZP sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e Índice de Seletividade.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) e seus respectivos genótipos representativos.....	19
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BZ	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
DC	Doença de Chagas
Dm28c	Cepa Dm28
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTUs	Unidades Discretas de Tipagem
ED ₅₀	Dose Efetiva de 50%
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IS	Índice de Seletividade
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LZP	Lansoprazol
MTT	(Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium])
NF	Nifurtimox
OXI	Oxiconazol
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Notificação de Agravos
TAU	<i>Triatomine Artificial Urine</i>
TAU3AAG	TAU suplementado com prolina, ácido glutâmico, aspártico e glicose
TDR	<i>Tropical Disease Research</i>
TTD	<i>Therapeutic Target Database</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 A doença de Chagas	15
2.2 Epidemiologia	15
2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
2.3.1 Unidades Discretas de Tipagem - DTUs.....	19
2.3.2 Ciclo de vida	20
2.3.3 Metaciclogênese	22
2.4 Metabolismo	24
2.4.1 Energético.....	24
2.4.2 Lipídico	25
2.5 Vetores e Transmissão	27
2.6 Tratamento	29
2.7 Reposicionamento de Fármacos	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Tipo de estudo	34
4.2 Fármacos selecionados para o estudo	34
4.3 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	34
4.4 Cultivo de células Vero	34
4.5 Ensaio de citotoxicidade em células Vero	35
4.6 Obtenção de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
4.7 Ensaio sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	36
4.8 Ensaio de inibição da metaciclogênese	36
4.9 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Determinação da CC₅₀ em células Vero	38
5.2 Determinação da CI₅₀ frente às formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	38
5.3 Influência da CI₅₀ dos fármacos ativos na metaciclogênese de <i>T. cruzi</i> ...	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	47

8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) afetam milhares de pessoas, causando consequências para saúde, economia e sociedade, uma vez que não recebem devida atenção global e estão associadas à exclusão social e condições ambientais, tais como: saneamento básico escasso, alterações climáticas, zonas de conflitos, dentre outras. A doença de Chagas está entre as 20 condições classificadas como DTN, juntamente com leishmanioses, dengue, chikungunya, dentre outras (OMS, 2023a).

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que pode ser transmitido por insetos hematófagos conhecidos como “ barbeiros”. Apesar de endêmica em 21 países da América Latina, acredita-se que a doença afete de 6 a 7 milhões de pessoas mundialmente, devido aos movimentos migratórios. Nas Américas, anualmente 30 mil novos casos são relatados, e 10 mil mortes ocorrem, além de milhares de pessoas estarem em risco de contrair a doença (OPAS, 2023; OMS, 2023b).

Existem dois fármacos recomendados para o tratamento, contudo, apresentam diversos efeitos adversos. E apesar da taxa de cura ser de 80% durante a fase aguda, na fase crônica os fármacos são pouco eficazes, sendo assim o fármaco de escolha para o tratamento é o Benznidazol, já que é mais tolerado do que o Nifurtimox. Portanto, busca-se novas opções terapêuticas para doença de Chagas, que tenham menos efeitos adversos (Oliveira *et al.*, 2008; Salomon, 2012).

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo demorado, além de ser altamente caro. O reposicionamento de fármacos visa nova utilização de fármacos já existentes em novos esquemas terapêuticos, e é uma estratégia mais rápida e menos dispendiosa, podendo utilizar estratégias computacionais (*in silico*) para obter informações de bancos de dados, integrando doença, alvo e droga (Ashburn; Thor, 2004; March-Vila *et al.*, 2017).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do Oxiconazol e Lansoprazol fármacos selecionados previamente por meio de ferramentas *in silico* em

formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes) e na diferenciação do *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A doença de Chagas

O brasileiro médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, no ano de 1909, identificou um parasito no sangue de Berenice, uma criança de dois anos de idade no interior de Minas Gerais. Este protozoário foi chamado de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem à Oswaldo Cruz. Carlos Chagas não somente identificou o agente etiológico, mas seu vetor e as características da doença (Chagas, 1909; Kropf; Lacerda; Whitty, 2009).

A doença de Chagas (DC) é caracterizada por duas fases clínicas distintas, aguda e crônica. Com a ocorrência da infecção, se inicia o período de incubação, que pode variar de dias até semanas a depender da rota de transmissão. Por consequência, há início da primeira fase, aguda, podendo durar até dois meses, com elevada parasitemia, assintomática na maioria dos casos e com fatalidade de 2 a 8% (Chatelain, 2016; Echeverria; Morillo, 2019).

Os sintomas inespecíficos e leves, quando presentes, incluem: febre prolongada, mal-estar, hepatoesplenomegalia, aumento de gânglios linfáticos e edema subcutâneo. Em raros casos pode haver presença de nódulos cutâneos (chagoma) ou edema unilocular indolor das pálpebras (sinal de Romanã) – demonstrando assim sinal de porta de entrada do parasito (Bern, 2015; Dutra *et al.*, 2009; Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010).

Com a diminuição da parasitemia é iniciada a fase crônica da doença, onde podem haver casos assintomáticos ou sintomáticos. Na ausência de sintomas ou fase indeterminada, em torno de 70% dos casos, os indivíduos podem ficar pelo resto da vida ou por até 30 anos nessa forma, nesse último caso, podem desenvolver sintomas. Em casos sintomáticos pode haver comprometimento cardíaco (forma mais comum e grave), digestivo ou forma mista (Bern, 2015; Dutra *et al.*, 2009; Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010).

2.2 Epidemiologia

Mundialmente estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas com o parasito, concentrando os maiores casos na América Latina, onde a doença é classificada como endêmica, com 10 mil mortes anuais e 30 mil novos casos (OPAS, 2023). Em locais onde a doença não corre naturalmente como Estados Unidos, Europa, Austrália e Japão, os novos casos ocorrem devido a transfusão de sangue e transmissão vertical e está associado a migração de pessoas viventes em áreas endêmicas (Carod-Artal; Gascon, 2010).

Irish *et al* (2022) fizeram um estudo da prevalência da DC entre adultos nos EUA (mas nascidos na América Latina). Durante 2014 a 2018, foi estimado que 287.711 adultos vivem com a DC, com a média de prevalência de 1,64%. No estudo de Rodríguez *et al* (2022) conduzido no Japão, de 428 participantes oriundos do Brasil, Bolívia e Peru, 7 positivaram para a doença, mostrando uma prevalência de 1,6%. Acredita-se que no Japão 3.000 pessoas estão infectadas.

Na América Latina, até 2019, foram 6.354.220 indivíduos diagnosticados. De 1990 a 2019, o Chile teve a maior prevalência, com 71,52%, seguido da Argentina (69,44%), Bolívia (65,56%), o Brasil ficou em 9º lugar (de 10), com 37,65% dos casos. Apesar das altas taxas, a prevalência diminuiu nos últimos 30 anos (Gómez-Ochoa *et al.*, 2022).

O boletim epidemiológico referente ao ano de 2020 aponta que no Brasil foram confirmados 146 casos de DC aguda, com letalidade de 2%. A região Norte teve a maior incidência da doença (95%), com a maioria dos caso ocorrendo no Pará e Amazonas. A região Nordeste ocupa o 2º lugar, seguido do Sudeste, Sul e na região Centro-Oeste não houve registro de casos. Dados sociodemográficos apontam que homens foram os mais afetados; dentre raça/cor, pardos ficam em primeiro, seguido de brancos e a média da idade é de 33,80 anos. O modo de transmissão oral que ocorre através da ingestão de alimentos contaminados representou 75,34% dos casos. Com relação a mortalidade, entre 1.925.691 mortes por COVID-19, 0,2% mencionaram Chagas como comorbidade (Brasil, 2021).

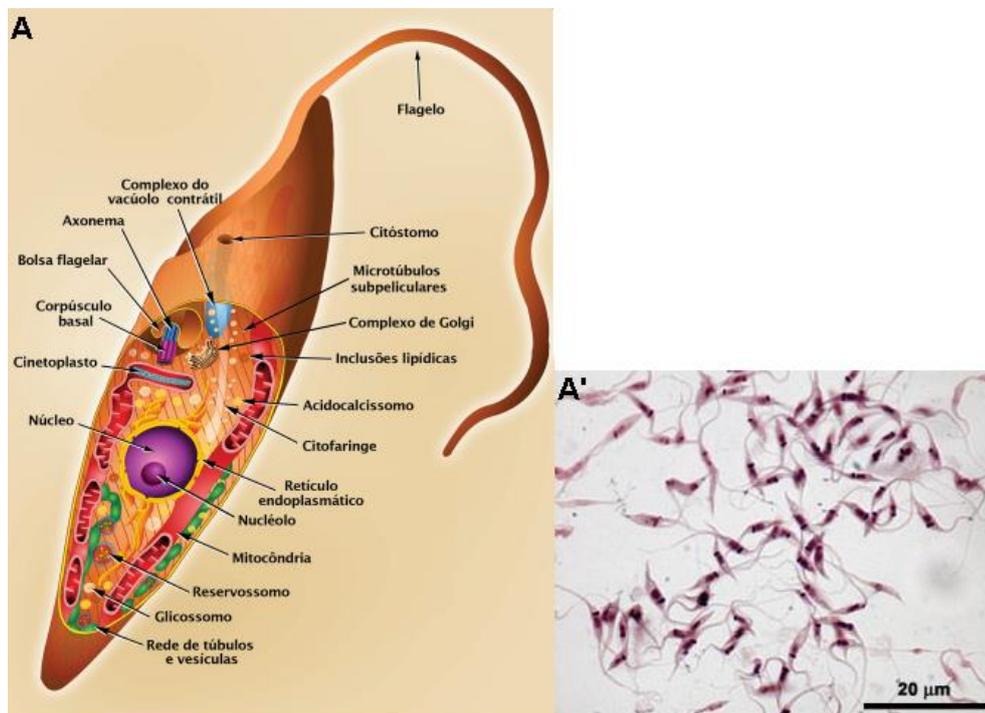
2.3 *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado *T. cruzi* pertence à classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Membros dessa ordem possuem o cinetoplasto, região específica da mitocôndria, onde está concentrado o DNA

mitocondrial (DNA do cinetoplasto-cDNA) (De Souza, 2002; Rassi; Rassi; Marcondes De Rezende, 2012), e sua posição na célula permite diferenciar suas três formas evolutivas de acordo com sua posição em relação ao núcleo e emergência do flagelo.

A forma epimastigota, replicativa no inseto vetor e em cultura axênica (*in vitro*), possui o formato alongado, com o cinetoplasto em formato de bastão, por onde emerge o flagelo que se estende pelo corpo e livre na região anterior e por onde se localiza o núcleo esférico (figura 1). A forma tripomastigota, forma infectante (figura 2), pode ser metacíclica (encontrada no vetor invertebrado ou *in vitro*) ou sanguínea (circulante no hospedeiro vertebrado) é alongada e fina, com o cinetoplasto arredondado, localizado na região posterior ao núcleo. Por fim, a forma amastigota (figura 3), forma replicativa e intracelular no hospedeiro vertebrado, é arredondada, com cinetoplasto em formato de bastão, localizado anteriormente ao núcleo, possuindo flagelo diminuto (Brener, 1997; Fiocruz, 2017).

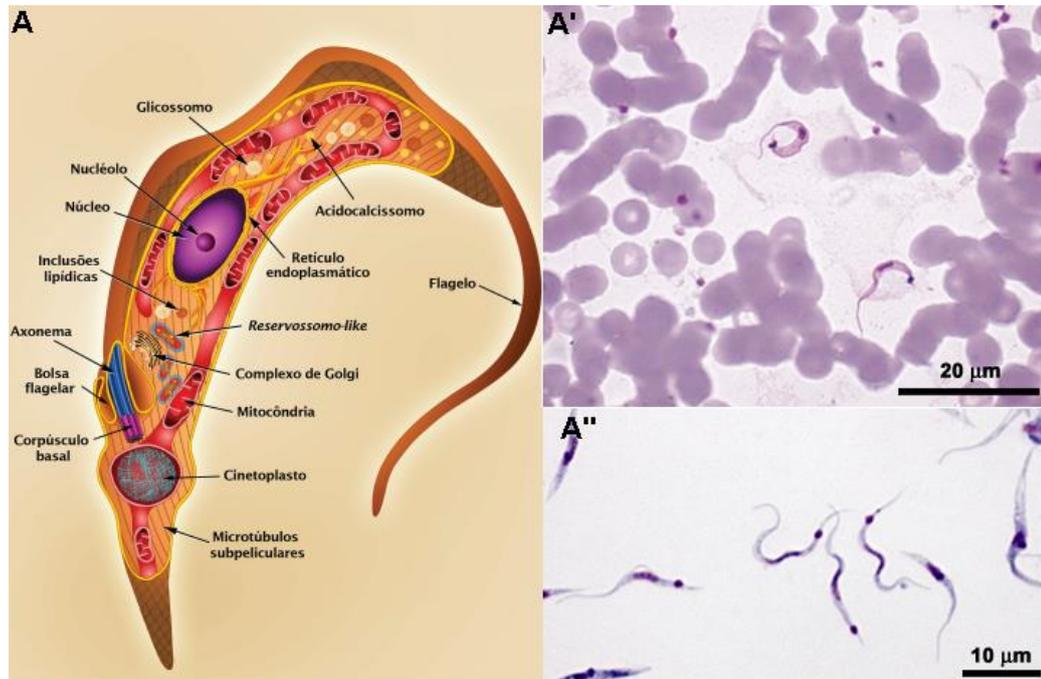
Figura 1 - Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Em (A) representação da forma replicativa no vetor. (A') Parasitos observados por microscopia óptica, corados com Giemsa, em aumento de 1.000x.

Fonte: Fiocruz (2017); Teixeira *et al* (2011).

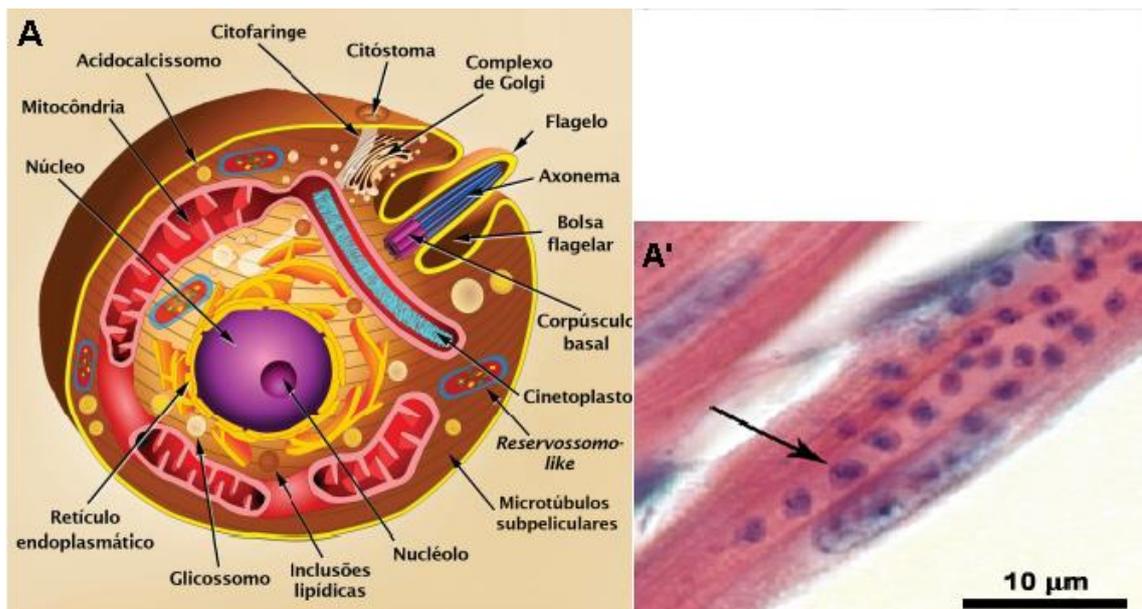
Figura 2 - Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Em (A) representação da forma infectante. (A') Tripomastigotas sanguíneas observados por microscopia óptica, corados com Giemsa, em aumento de 1.000x. (A'') Tripomastigotas metacíclicas, corados com Giemsa, em aumento de 1.000x.

Fonte: Fiocruz (2017); Teixeira *et al* (2011).

Figura 3 - Formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Em (A) representação da forma intracelular. (A') Seta apontando formas amastigotas, localizadas em célula muscular de camundongo, observadas por microscopia óptica, corados com Giemsa, em aumento de 1.000x.

Fonte: Fiocruz (2017); Teixeira *et al* (2011).

2.3.1 Unidades Discretas de Tipagem - DTUs

As cepas de *T. cruzi* apresentam muitas diferenças referentes à morfologia, DNA, patogenicidade e outras características biológicas, mostrando assim uma ampla heterogeneidade (Zingales, 2011). Devido a isso, populações geneticamente mais relacionadas entre si do que outras por possuírem marcadores genéticos, moleculares e imunológico são agrupadas em Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) (quadro 1). Atualmente existem sete DTUs (TcI a TcVI) e Tcbat (associado à morcegos), algumas com perfis relacionados ao ciclo de transmissão silvestre, doméstico ou ambos (Tibayrenc, 1998; Zingales *et al.*, 2012).

Quadro 1 - Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) e seus respectivos genótipos representativos.

DTU	Genótipos representativas
TcI	Dm28c, Sylvio X-10, YuYU e Colombiana
TcII	Y, Esmeraldo c13, Berenice 62 e VL 10
TcIII	CM17
TcIV	CanIII
TcV	SO3, 115 e Arequipa
TcVI	CL Brener e Tulauhen

Fonte: Zuma, Barrias; De Souza (2020)

A grande diversidade de cepas também reflete na quantidade de reservatórios que o *T. cruzi* é capaz de infectar. São descritas mais de 100 espécies de mamíferos como gambás, roedores, primatas, morcegos, dentre outros. E parece haver uma relação de ordens de mamíferos associados à determinadas DTUs, como por exemplo, TcI sendo mais frequentemente encontrado em várias ordens de mamíferos diferentes (58,3%), o que pode ser explicado pela distribuição geográfica do parasito e de seus hospedeiros. A relação vetor invertebrado e DTUs também foi investigada, cepas pertencentes a TcI conseguiram completar seu ciclo em *Rhodnius prolixus*, já as pertencentes TcII não (Brenière; Waleckk; Barnabé, 2016; Zingales; Bartholomeu, 2022).

Nesse contexto, as diferentes cepas possuem diferentes variações antigênicas, e que podem levar a diferentes desfechos dado a relação parasito-hospedeiro considerando a resposta imune contra tais antígenos. Algumas DTUs estão associadas à forma indeterminada e cardíaca, como TcI; outras com a forma indeterminada, cardíaca e digestiva (TcII), todos esses fatores associados também determinam distintas susceptibilidades ao tratamento (Magalhães *et al.*, 2022).

2.3.2 Ciclo de vida

Tendo como ponto de partida o hospedeiro vertebrado, formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas juntamente com as excretas do triatomíneo e a contaminação ocorre quando esses dejetos entram em contato com regiões lesionadas da pele (devido ao ato de coçar) ou pelas mucosas (Vianna Martins *et al.*, 2012).

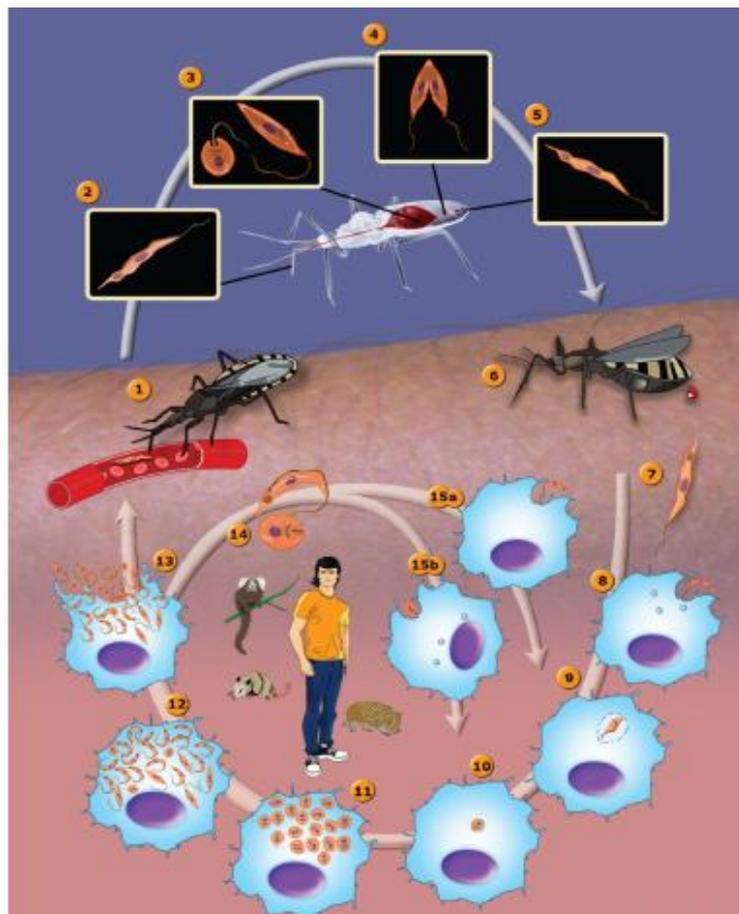
Essas formas infectantes invadem diversos tipos celulares como: células epiteliais, macrófagos, células musculares e fibroblastos. O processo de invasão do parasito nas células ocorre através do contato de moléculas presentes em ambas as membranas através dos processos de adesão e reconhecimento. Após isso, há a formação do vacúolo parasitóforo, no qual lisossomos se fundem e liberam enzimas, com isso, ocorre a diferenciação da forma tripomastigota metacíclica para forma amastigota e posterior multiplicação por fissão binária. No citoplasma da célula ocorre nova diferenciação para formas tripomastigotas sanguíneas, culminando no rompimento da célula e liberação de parasitos no sangue periférico e tecidos do hospedeiro vertebrado. No sangue, agora as formas sanguíneas infectam novas células, repetindo o ciclo.

O parasito apresenta um certo polimorfismo, onde duas formas podem ser encontradas no sangue: a forma delgada, mais infecciosa e mais hábil para infectar os tecidos e causar parasitemia precoce; já a forma larga, permanece mais tempo na circulação (De Souza; Carvalho; Barrias, 2010; Martín-Escolano *et al.*, 2022; Teixeira *et al.*, 2011; Zuma; Barrias; De Souza, 2020).

O ciclo tem continuidade quando um triatomíneo, ao fazer o repasto sanguíneo, ingere formas tripomastigotas sanguíneas e algumas amastigotas, na qual sofrem processo de diferenciação (Garcia *et al.*, 2010; Tyler; Engman, 2001).

No estômago, podem ser encontradas formas epimastigotas e outras morfologias, tais como amastigotas, esferomastigotas com flagelo aparente e formas intermediárias. Todas essas formas se diferenciam na forma epimastigota, replicativa. Ao chegarem no intestino, as formas epimastigotas se multiplicam de forma contínua e no reto se fixam pelo flagelo e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que são liberadas nas fezes, repetindo o ciclo (Garcia *et al.*, 2010; Tyler; Engman, 2001). Todo o processo de ciclo de vida é representado pela figura 4.

Figura 4 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Números de (1) a (6) – representam os acontecimentos no vetor; demais números o que ocorre no hospedeiro vertebrado. (1) Vetor durante o repasto sanguíneo ingerindo formas tripomastigotas sanguíneas. (2) Forma tripomastigota sanguínea. (3) Diferenciação de formas epimastigotas e esferomastigotas. (4) Multiplicação por fissão binária. (5) Transformação em tripomastigota metacíclica. (6) Vetor durante o repasto sanguíneo e liberando pelos dejetos as formas infectantes. (7) Invasão do parasito em macrófagos. (8) Dentro da célula hospedeira. (9) Formação do

vacúolo parasitóforo e diferenciação para forma amastigota. (10) Forma amastigota no citoplasma livre do vacúolo. (11) Processo de multiplicação. (12) Diferenciação de amastigota para tripomastigota. (13) Rompimento da célula. (14) Formas amastigotas e tripomastigotas. (15a) Forma infectante infectando macrófago, (15b) Forma amastigota infectando macrófago.

Fonte: Teixeira *et al* (2011).

2.3.3 Metacicloênese

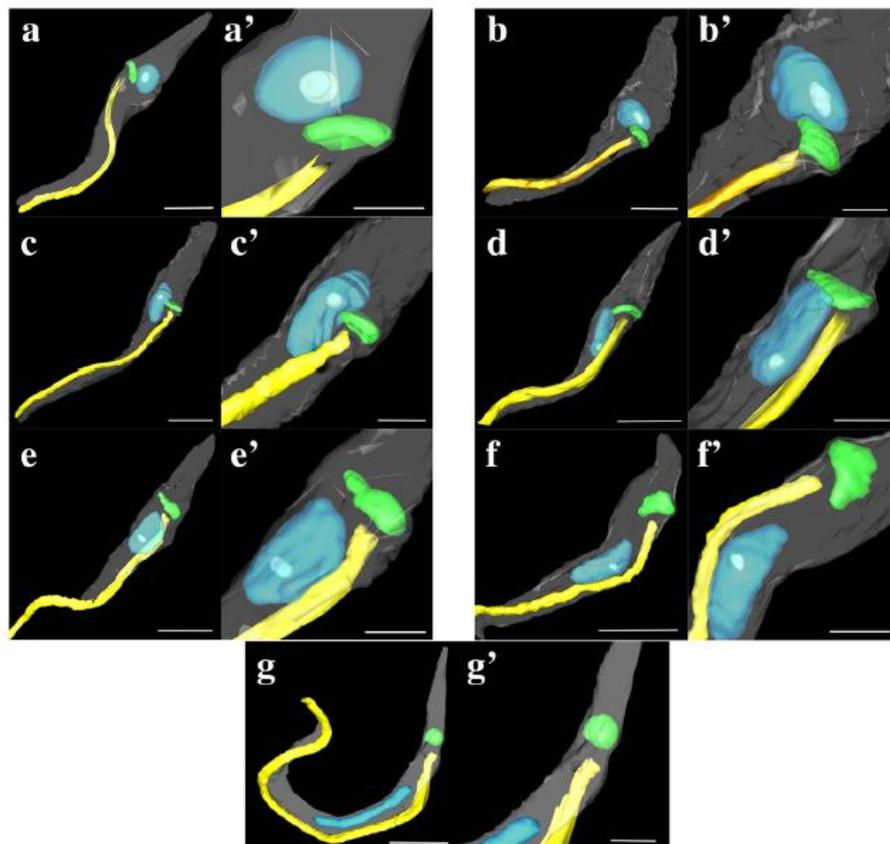
O processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas é denominado metacicloênese, e são descritos diversos fatores que induzem a esse processo como: pH, osmolalidade (Kollien; Schaub, 2000), a presença de cAMP e ativadores da adenilato ciclase (Gonzales-Perdomo; Romero; Goldenberg, 1988). Hamedi *et al.*, (2015) demonstraram que o estresse nutricional ativa e aumenta os níveis dessas moléculas. Ademais, a diferenciação ocorre no reto do inseto vetor, onde as formas epimastigotas aderem à parede do reto, fator que pode ser importante. A adesão ao substrato também ocorre *in vitro*, e parece estar associado ao estresse nutricional (Bonaldo *et al.*, 1988; Figueiredo; Rosa; Soares, 2000). Ávila *et al* (2001) isolaram um gene que é expresso por epimastigotas que aderiram ao substrato e que estão em diferenciação, esse gene foi chamado de metacicloênina e parece estar associado à adesão.

São observadas mudanças estruturais e morfológicas durante a metacicloênese. Conforme a diferenciação ocorre as formas epimastigotas com seu cinetoplasto em forma de disco e o flagelo localizados anteriormente ao núcleo com formato arredondado, se diferenciam em formas intermediárias nas quais o conjunto flagelo e cinetoplasto migram para a região posterior ao núcleo. Durante esse momento é observado que o cinetoplasto sofre alteração em seu formato, e o núcleo fica mais alongado. Ao final da diferenciação, dando origem à forma tripomastigota, o cinetoplasto agora com o formato arredondado e o flagelo estão localizados na região posterior do parasito (Gonçalves *et al.*, 2018). Essas modificações podem ser observadas na figura 5.

É possível observar a existência de três formas intermediárias durante o processo de diferenciação, sendo elas: forma A - semelhante a epimastigota com o cinetoplasto na porção anterior e próximo ao núcleo; forma B - com núcleo e cinetoplasto lado a lado, e forma C - semelhante a tripomastigota, com o cinetoplasto

posterior ao núcleo. Além disso, durante o processo de diferenciação, nas primeiras 24 horas 40% dos parasitos são classificados predominantemente como forma A. Com 48 horas predominantemente B e C e com 72 horas muitos já haviam desadherido do substrato e foram classificados como metacíclicos (Ferreira *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2016).

Figura 5 - Reconstrução tridimensional das etapas da metaciclogênese de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Reconstrução do processo de diferenciação de *T. cruzi*. Em **a** é observado a forma epimastigota. **b-d** são formas intermediárias I. **e** intermediário II. **f** intermediário III e em **g** forma tripomastigota metacíclica. É demonstrado o flagelo (amarelo), cinetoplasto (verde), núcleo (azul) e membrana celular (cinza). Escala **a-g** 2.5 µm; **a'-g'**, 1 µm.

Fonte: Gonçalves *et al.*, (2018).

Durante a metaciclogênese, ocorrem também mudanças nos reservossomos, organela que acumula proteínas e lipídios e que estão presentes nas formas replicativas. Acredita-se que o parasito acumule essas moléculas e as utilize como fonte energética durante a diferenciação, acarretando na degradação e desaparecimento da organela (Cunha-e-Silva *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 1989).

Outra estrutura do parasito que sofre alterações durante o processo de diferenciação é o complexo citóstoma-citofaringe. Esse complexo está associado a roda endocítica, sendo classificado como uma invaginação da membrana plasmática que adentra pela célula. Essa estrutura possui uma abertura, o citóstimo, enquanto a citofaringe é a porção interna que foi invaginada (De Souza; Sant'Anna; Cunha-e-Silva, 2009). Vidal *et al* (2016) demonstraram que esse complexo sofre realocação para região posterior da célula durante o processo de diferenciação. Além disso formas intermediárias são capazes de fazerem endocitose por esse complexo, e o mesmo desaparece em formas intermediárias C tardias.

2.4 Metabolismo

Os fármacos utilizados neste estudo foram selecionados por meio de ferramentas *in silico*, utilizando como filtro "metabolismo energético" e "metabolismo lipídico".

O metabolismo energético está associado à forma de como um determinado organismo produz ATP para o seu funcionamento e proliferação. Carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos são utilizados como substratos (Tielens; Van Hellemond, 2009).

O metabolismo lipídico envolve processos de catabolismo celular também envolvido na produção de energia ATP, assim como processos de biossíntese de lipídios com diferentes funções na estrutura e funcionamento celular (Harayama; Riezman, 2018).

2.4.1 Energético

Em seu ciclo de vida, o *T. cruzi* tem a necessidade de se adaptar a ambientes ricos e pobres em glicose para obter fonte energética, por exemplo, no hospedeiro invertebrado os aminoácidos L-prolina e L-glutamina são abundantes em seus fluídos e hemolinfa, formas epimastigotas as utilizam como fonte energética, mas podem, e preferem, utilizar a glicose quando tanto os aminoácidos quanto a glicose estão disponíveis. Enquanto as formas tripomastigotas sanguíneas utilizam a glicose,

abundante nos fluídos de hospedeiros vertebrados, e as formas amastigotas, intracelulares, utilizam açúcar fosfato, abundante no citoplasma da célula hospedeira, e acredita-se que talvez possam utilizar ácidos graxos também (Bringaud; Rivière; Coustou, 2006; Cazzulo *et al.*, 1985; Shah-Simpson *et al.*, 2017; Silber *et al.*, 2009).

Diferente dos demais eucariotos, nos kinetoplastidas a via glicolítica ocorre de forma compartimentada, pois esses organismos possuem uma organela relacionada aos peroxissomos, denominada de glicossomo. Nos glicossomos de *T. cruzi* foram identificadas diversas enzimas envolvidas no metabolismo energético, como as seis primeiras enzimas da via glicolítica e enzimas relacionadas às vias das pentoses-fosfato, recuperação de purinas, β -oxidação, síntese de pirimidinas, éter-lipídeos e esqualeno (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011; Michels *et al.*, 2006; Opperdoes, 1987; Quiñones *et al.*, 2020).

Todos os tripanosomatídeos, exceto *T. brucei*, possuem nos glicossomos duas enzimas (cinases) adicionais, nas quais os produtos finais são malato ou piruvato, este último é degradado para vários produtos finais como L-alanina e L-lactato (Bringaud; Rivière; Coustou, 2006).

Duas enzimas reguladoras da glicólise, hexoquinase e fosfofrutoquinase, não possuem inibidores, portanto tais enzimas não são afetadas pela presença ou ausência de oxigênio, e acredita-se que o fato das primeiras seis enzimas estarem localizadas nos glicossomos seja uma forma de compensar a falta de regulação (Cazzulo, 1992; Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

A degradação da glicose também é importante para a via das pentoses-fosfato e está ativa em tripanosomatídeos. Essa via se inicia na glicólise e possui dois ramos, um oxidativo no qual forma NADPH necessário como doador de hidrogênio em vias redutoras envolvidas em biossíntese e defesa contra stress oxidativo, e outro não-oxidativo formando a ribose-5-fosfato envolvida na biossíntese de nucleotídeos. As sete enzimas estão presentes em todas as formas evolutivas de *T. cruzi* (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011; Tiellens; Van Hellemond, 1998).

2.4.2 Lipídico

De modo geral, os lipídios possuem diferentes funções, são constituintes de membranas plasmáticas conferindo fluidez e servem como barreira, separando o lado interno do ambiente externo. Dentre algumas outras funções estão associados à produção de energia e sinalização para múltiplos processos celulares (Harayama; Riezman, 2018; McMahon; Gallop, 2005; Nakamura; Yudell; Loor, 2014; Wymann; Schneider, 2008).

Existe uma diversidade de lipídios, o que leva a diferentes composições de membranas. Em epimastigotas, 34,7% do total de lipídios é representada por fosfolipídios, em amastigotas e tripomastigotas, esse tipo de lipídio corresponde a 60-70% de lipídios de membrana. Dentre os fosfolipídios, a fosfatidilcolina se destaca, nas formas epimastigota, representando 44% do total de fosfolipídios; nas formas amastigotas e tripomastigotas, corresponde a 25,24% e 29,34%. O percentual de fosfatidilinositol varia entre as formas, sendo o terceiro lipídio mais abundante na forma epimastigota representando 12,3%; em tripomastigotas, corresponde a 25,42%, o segundo mais abundante e em amastigota, é o terceiro mais abundante com 14,06% (Booth; Smith, 2020; Harayama; Riezman, 2018; Oliveira; Timm; Costa, 1977).

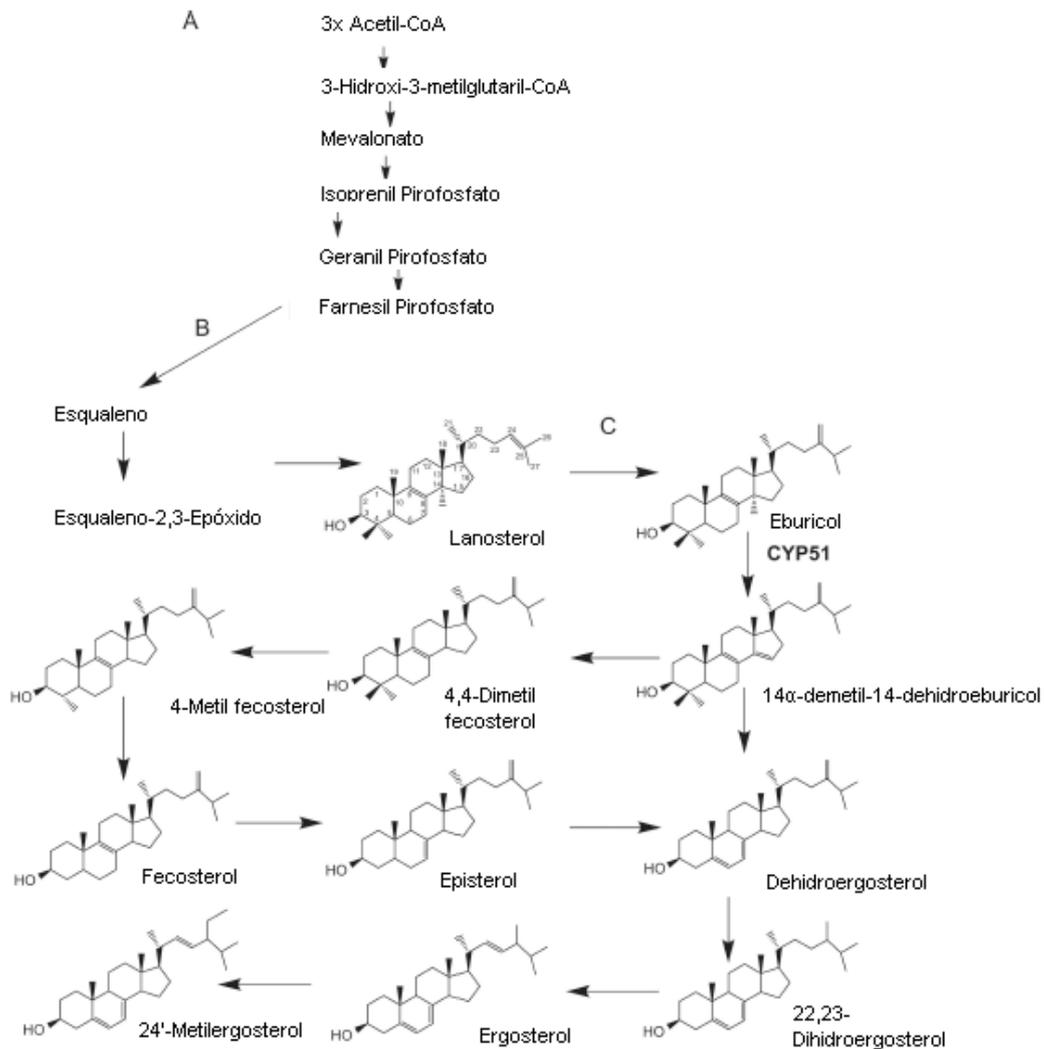
Dentre os glicerolfosfolipídios, as proporções de fosfatidiletanolamina são superiores nas formas epimastigotas, representando 27,8%. Contudo nas formas amastigotas e tripomastigotas as proporções são semelhante, representando 13,50% e 10,98% (Booth; Smith, 2020; Harayama; Riezman, 2018; Oliveira; Timm; Costa, 1977).

Os esteróis, classe de lipídios, estão presentes nas membranas de eucariotos dando fluidez, rigidez e atuando na permeabilidade. Dentre eles temos o colesterol, que está presente em membranas de animais, e o ergosterol presente em fungos e nos tripanosomatídeos. Nos demais eucariontes a síntese de esteróis ocorre no retículo endoplasmático, enquanto que em Trypanosomatidae as enzimas para esta síntese estão localizadas nos glicossomos e mitocôndria (Lepesheva; Villalta; Waterman, 2011; Nelson; Cox, 2013).

Em todos os eucariotos que sintetizam ergosterol, a síntese tem origem na via do mevalonato, que através da condensação de 3 acetil-coA e de vários passos culminam na produção de farnesil pirofosfato que é convertido em esqualeno seguido de esqualeno-2,-3-epóxido, para no fim formar lanosterol. Após isso, as próximas

etapas são específicas de *T. cruzi*, em que o lanosterol é convertido em eburicol e através de vários passos é formado ergosterol e 24'-metilergosterol, um análogo ao ergosterol (Lepesheva; Villalta; Waterman, 2011). Os passos dessa via podem ser observados na figura 6.

Figura 6 - Via do Mevalonato em *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Processo de síntese de ergosterol. Em (A) Via do mevalonato. (B) Etapas específicas de eucariotos. (C) Etapas presentes em *T. cruzi*.

Fonte: Traduzido de Lepesheva; Villalta; Waterman(2011)

2.5 Vetores e Transmissão

Conhecidos e denominados pela população como barbeiros, os vetores do agente etiológico da doença de Chagas são insetos hematófagos pertencentes a à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, agrupados em 18 gêneros com 157 espécies descritas. No Brasil, três gêneros são os de maiores relevância: *Triatoma* sp., *Panstrongylus* sp. e *Rhodnius* sp., com 64 espécies descritas ao todo (Alevi *et al.*, 2021; Galvão; Paula, 2014; Jurberg *et al.*, 2014; Rezende; Rassi, 2008).

As principais formas de transmissão são a vetorial, a oral e por transfusão sanguínea. A vetorial ocorre quando os parasitos são eliminados pelas excretas e penetram mucosas ou pele lesionada durante o repasto sanguíneo do inseto. O Brasil em 2006 recebeu pela Organização Pan-Americana de Saúde o certificado de Eliminação da transmissão pelo *Triatoma infestans*, principal vetor da doença. Apesar disso, ainda há relatos de pequenos focos de *T. infestans* em alguns estados brasileiros e a existência de outros triatomíneos incriminados como vetores (Coura, 2014; De Souza; De Carvalho; Barrias, 2010; Ferreira; Silva, 2006).

Atualmente a transmissão oral tem sido considerada a principal rota de contaminação e tem causado surtos na América do Sul, o mais recente surto no Brasil ocorreu na Bahia em 2023, onde cinco casos foram confirmados pelo Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN) com uma morte registrada o que corresponde a 20% de letalidade (Brasil, 2023). No Brasil, o consumo de açaí (*Euterpe oleracea*) tem sido apontado como principal fonte de contaminação amazônica, especialmente no Pará. Outras fontes de contaminação como caldo de cana, água e bacabá (*Oenocarpus bacaba*) também foram relatadas (Nóbrega *et al.*, 2009; Shikanai-Yasuda; Carvalho, 2012).

Durante as décadas de 1970 a 1990, com a queda da transmissão vetorial, começou a ser observada a transmissão por transfusão sanguínea. Em 1970 registrou-se de 3,9 a 10,4% de positividade entre doadores de sangue no Brasil. Em 2005 essa positividade diminuiu chegando a 0,21%, provavelmente devido a controle de qualidade do sangue através de triagem sorológica de doadores e a utilização de métodos sorológicos mais específicos (Brasil, 2004; Moraes-Souza; Ferreira-Silva, 2011).

Além destas três principais formas de transmissão existe a possibilidade de transmissão vertical (Coura, 2007). O Consenso Brasileiro em Doença de Chagas define que:

A transmissão vertical deve ser considerada em crianças nascidas de mães com sorologia positiva para *T. cruzi*. Para a confirmação de caso é necessário identificar parasitos no sangue do recém-nascido e/ou anticorpos de origem não materna (após 6 a 9 meses de idade), desde que excluídos outros mecanismos de transmissão (Brasil, 2005, p. 11).

Em 2022 foi criado o Pacto Nacional para Eliminação da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis, Hepatite B e a Doença de Chagas como Problema da Saúde Pública. No documento existe uma meta de impacto específica para a DC vertical que aponta: “ Obter a cura comprovada por exame sorológico negativo após o tratamento em 90% ou mais das crianças diagnosticadas com infecção por *T. cruzi* até 2030” (Brasil, 2022, p. 13). Além de diversas metas de processo a serem cumpridas até o ano de 2030, e ações para eliminar a transmissão vertical, envolvendo vigilância e atuação na atenção primária à saúde (Brasil, 2022).

Os casos menos frequentes de transmissão que incluem: aleitamento materno, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e transmissão sexual. Ademais, é apontado a possibilidade de que o gambá (*Didelphis marsupialis*) possa atuar como vetor e reservatório. Deane, Lenzi e Jansen (1984) demonstraram que formas epimastigotas se multiplicam e diferenciam em tripomastigotas metacíclicas infectantes nas glândulas odoríferas do marsupial, semelhante ao que ocorre nos triatomíneos e que ao expelir secreção podem transmitir parasitos para os alimentos (Coura, 2007; Dias; Amato Neto; Luna, 2011).

2.6 Tratamento

Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são fármacos nitroheterocíclicas, como o Benznidazol (BZ), derivado do nitroimidazol, e o Nifurtimox (NF), derivado do nitrofurano. Em ambos os casos, o grupamento nitro sofre redução pelas nitroredutases formando radicais livres (os quais se associam à DNA, proteínas

e lipídios, lesando a célula) intermediários e metabólitos (Maya *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Wilkinson; Kelly, 2009).

Apesar da semelhança no mecanismo de ação, os dois apresentam suas particularidades. O BZ através dos intermediários de nitrorredução, modifica covalentemente macromoléculas, causando estresse redutivo. Já o nifurtimox causa estresse oxidativo pela redução do grupo nitro, formando os radicais nitroânios que formam metabólitos tóxicos de oxigênio reduzido (Urbina, 1999, 2002).

As taxas de cura parasitológica resultados negativos em teste parasitológico e sorológico para os dois fármacos são de 80% durante a fase aguda. Na fase crônica da doença as taxas de curas decaem significativamente, de 8% a 30% (Oliveira *et al.*, 2008; Urbina; Docampo, 2003). Ferreira (1990), demonstrou que de 50 pacientes na fase indeterminada tratados com o BZ, 70% apresentaram testes negativos no xenodiagnóstico e 10% sorologia não reativa; no caso do NF obteve-se negatificação em 50% no xenodiagnóstico e 6% na sorologia.

Nitrocompostos, como os usados para o tratamento da DC, possuem diversos efeitos citotóxicos relatados, sendo comum no tratamento com o BZ reações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e neuropatia periférica. No caso do NF, há manifestação de sintomas digestivos (vômito, náuseas, diarreia e etc.) e sintomas neuropsiquiátricos. O NF pode ser utilizado em casos de falha no tratamento com o BZ. (Dias *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2008; Paula; Serrano; Tavares, 2009).

O BZ é o medicamento de escolha, já que é melhor tolerado. Apesar disso, Pontes *et al* (2010) em estudo com 32 pacientes brasileiros do estado do Ceará, apontam que 28,57% dos pacientes precisaram descontinuar o tratamento com BZ devido às reações adversas. Nesse panorama, a pesquisa por drogas menos tóxicas e mais efetivas é necessária (Dias *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2008; Paula; Serrano; Tavares, 2009).

2.7 Reposicionamento de Fármacos

A disponibilização de uma nova droga no mercado envolve um processo longo e custoso, com menos de 10% de sucesso, podendo durar até 17 anos. A estratégia

de reposicionamento de fármacos, ou seja, propor novos usos para fármacos já aprovados, reduz significativamente os custos com o processo e conseqüentemente o tempo, para a aprovação do seu uso para novos alvos, durando no máximo 12 anos. Um dos exemplos é o uso do Minoxidil, que a princípio foi desenvolvido para o tratamento de hipertensão, mas atualmente é utilizado para tratar a queda de cabelo (Ashburn; Thor, 2004; Dudley; Deshpande; Butte, 2011).

As doenças infecciosas ocasionadas por protozoários causam milhares de mortes anuais e muitas drogas para seu tratamento não são satisfatórias o que gera a necessidade de um substituto. Este é o exemplo da Anfotericina B lipossomal que era utilizada para tratamento de pacientes com doenças causadas por fungos dos gêneros *Aspergillus* spp, *Cryptococcus* spp, dentre outros, e que em 1997 foi aprovada para o tratamento da leishmaniose visceral causada pelos parasitos *Leishmania infantum* e *L. donovani* (Andrews; Fisher; Skinner-Adams, 2014; Meyerhoff, 1999; Sundar; Chakravarty, 2010).

Uma das ferramentas computacionais que pode ser utilizada para se chegar a um fármaco a ser reposicionado é análise *in silico*. Esta ferramenta utiliza informações de banco de dados sobre estruturas moleculares, metabolismos, absorção, entre outras e as relaciona com a potencial atividade biológica de um determinado composto químico (Madden *et al.*, 2020; Vanhaelen *et al.*, 2017). Alguns bancos de dados oferecem informações sobre fatores de transcrições, interações proteicas, e outros alvos, como é o caso do *Therapeutic Target Database (TTD)*. Enquanto que o DrugBank tem como base informações a respeito de fármacos, seus alvos e mecanismos de ação (Wang *et al.*, 2020; Wishart *et al.*, 2008).

Existem bancos de dados mais específicos, voltados para doenças negligenciadas e tropicais, como é o caso do *Tropical Disease Research (TDR Targets)* ou “ Pesquisa de Doenças Tropicais” no qual é possível identificar alvos moleculares, informações genômicas e uma variedade de outras informações. Temos o *TriTrypDB* onde é possível ter acesso a informações sobre genomas de espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Esse site é mais específico e tem como foco parasitos kinetoplastidas (Trypanosomatidae) (Aslett *et al.*, 2010; Magariños *et al.*, 2012).

Garcia (2022), utilizou ferramentas *in silico* com o objetivo de selecionar fármacos de uso em humanos cujo os alvos apresentavam similaridade com alvos em *T. cruzi*. Para tanto foram utilizados bancos de dados disponíveis gratuitamente, como por exemplo, DrugBank, TDR Targets, TTD e TriTrypDB. Oxiconazol (OXI) e Lansoprazol (LZP) foram selecionados, por apresentarem potencial atividade biológica *in vitro* frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*.

O OXI, fungicida de amplo espectro derivado do Imidazol. Utilizado para tratar diversas dermatites e tem alguns alvos, um deles é a enzima Lanosterol sintase, cuja inibição impede a síntese de ergosterol, lipídeo essencial para manter a integridade da membrana celular de organismos como *T. cruzi* (DrugBank, 2023a).

LPZ, classificado como um benzimidazol substituído. É usado para tratar úlceras gástricas e refluxo. Ele age na bomba de prótons H⁺K⁺-ATPase das células parietais e regula os níveis de secreção gástrica (Barradell; Faulds; Mctavish, 1992; DrugBank, 2023b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial atividade dos fármacos OXI e LZP sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração de OXI e LZP capaz de inibir 50% da viabilidade celular sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* Dm28c;
- Avaliar a citotoxicidade de OXI e LZP sobre células Vero;
- Avaliar a influência OXI e LZP no processo de diferenciação *in vitro* dos parasitos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Pesquisa experimental, analítica e quantitativa. Realizada por meio de ensaios *in vitro* utilizando uma população clonal do protozoário *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c (Contreras *et al.*, 1985).

4.2 Fármacos selecionados para o estudo

Os fármacos utilizados neste estudo foram previamente selecionados por Garcia (2022) por meio de ferramentas *in silico*, dos quais não havia sido reportada a atividade anti-*T. cruzi* Dm28c. De sete drogas focadas no metabolismo lipídico e energético, duas com melhores resultados frente às formas epimastigotas do parasito foram selecionadas para este trabalho, sendo elas o Oxiconazol (Sigma SML1474) e o Lansoprazol (Sigma L8533).

4.3 Cultivo de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram mantidas através de repiques periódicos (semanalmente), a 28 °C, em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). Para os ensaios *in vitro* foram utilizados parasitos em fase exponencial de crescimento (Contreras *et al.*, 1985).

4.4 Cultivo de células Vero

As células Vero (ATCC: CCL-81) foram mantidas em repiques periódicos (3-5 dias) com no mínimo de 70% de crescimento contínuo. As culturas foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de

SBF, 2 mM de L-glutamina, pH 7.2. Mantidas em estufa úmida em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C (De Almeida *et al.*, 2021).

4.5 Ensaio de citotoxicidade em células Vero

Foram semeadas em placa de 96 poços 2×10^5 células por poço, sob as mesmas condições em que foram cultivadas. Após 24 horas foi verificado se houve a adesão das células na placa, e as mesmas foram incubadas em diferentes concentrações de cada fármaco, sendo o Oxiconazol 500 a 31,5 µg/mL e o Lansoprazol 200 a 12,5 µg/mL. O Benznidazol foi utilizado como droga de referência nas concentrações de 1.600 e 800 µM e o meio DMEM como controle negativo.

O ensaio colorimétrico com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) fora realizado para avaliar a viabilidade celular. As células foram incubadas por 5 horas na presença de 50µL MTT na concentração de 2mg/mL, após isso os cristais formados foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. Em seguida, a leitura da placa foi feita em espectrofotômetro a 570nm para determinar a absorbância da redução do Formazam. Assim foi determinado a CC₅₀ (concentração citotóxica de 50%) pelo cálculo da média da porcentagem de inibição celular, em relação ao controle não tratado com os fármacos, obtido através da quadruplicata do ensaio para cada concentração (De Almeida *et al.*, 2021).

4.6 Obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas metacílicas foram obtidas *in vitro*, sob condições químicas definidas conforme o protocolo de Contreras; Morel; Goldenberg, 1985a; Contreras *et al.*, 1985b e Bonaldo *et al.*, 1988. Formas epimastigotas em fase *log* tardia (5º dia de cultivo) foram coletadas e centrifugadas a 8.000xg por 10 min a 4 °C, em seguida na densidade de 5×10^8 /mL parasitos foram incubados em meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU) pH 6.0, por 2 horas a 28 °C. Após o estresse nutricional, os parasitos foram transferidos para uma garrafa de cultivo contendo TAU3AAG (TAU

suplementado com prolina, ácido glutâmico, aspártico e glicose) com pH 6.0. Em 96 horas formas, tripomastigotas metacíclicas foram obtidas para realizar os testes.

4.7 Ensaio sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas metacíclicas obtidas pelo processo de metaciclogênese *in vitro*, conforme descrito no item 4.6, foram semeadas em eppendorfs na densidade celular de 5×10^6 células/mL durante 6 horas de tratamento nas concentrações de 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do Lansoprazol e 200, 150 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do Oxiconazol; o Benznidazol foi usado como droga de referência nas concentrações de 1600 e 800 μM e PBS 1% (*Phosphate buffered saline*) como controle negativo (não tratado). Posteriormente, os parasitos foram avaliados e contados em câmara de Neubauer. Após, foi calculada concentração inibitória de 50% (CI_{50}). Os valores obtidos da CI_{50} e da CC_{50} foram usados para definir o Índice de Seletividade (IS) que foi determinado pela razão da CI_{50} e da CC_{50} de cada fármaco (De Almeida *et al.*, 2021).

4.8 Ensaio de inibição da metaciclogênese

Durante o processo de estresse nutricional, as formas epimastigotas foram incubadas com os valores obtidos da CI_{50} do Oxiconazol do Lansoprazol. E para o controle de não inibição foram incubadas com PBS 1%. Após o tratamento, os parasitos foram semeados em garrafas de cultivo com meio TAU3AAG por 96 horas (Contreras *et al.*, 1985). Em sequência, os parasitos foram contados vivos em câmara de Neubauer e, posteriormente foi calculado o percentual de inibição (Cardoso; Soares, 2010).

4.9 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas ou quadruplicatas sendo os resultados obtidos através da média de cada concentração. Os valores de CI_{50} e CC_{50} foram obtidos através de regressão não linear dos valores percentuais de inibição com relação ao log de cada concentração de cada fármaco. O índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão entre o valor de CC_{50} pelo valor de CI_{50} . Análises estatísticas foram realizadas utilizando os *softwares Microsoft Excel 2020* e o *GraphPadPrism 7*.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da CC₅₀ em células Vero

O OXI apresentou elevada citotoxicidade (45,11 µM), já o LZP e o Benznidazol não afetaram a viabilidade celular em 24 horas, com CC₅₀ de >541 µM e 854,4 µM, respectivamente (tabela 1).

Tabela 1 - Concentração Citotóxica de 50% dos fármacos sobre células Vero.

Fármaco	Citotoxicidade – CC ₅₀	R ²	Intervalo de Confiança (95%)
Lansoprazol	>541 µM	Nc	Nc
Oxiconazol	45,11 µM	0,9986	13,44 a 27,89
Benznidazol	854,4 µM	0,9840	144,0 a 1919

Legenda: 24 horas de incubação. R² = Coeficiente de determinação. Nc = Não calculado.

5.2 Determinação da CI₅₀ frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Após 6 horas de incubação, o OXI apresentou uma CI₅₀ de 279,6 µM, indicando atividade anti-*T.cruzi* e um IS de 0,16 mostrando que nas condições ensaiadas este fármaco não possui um efeito seletivo, sendo tão ativo contra o parasito a célula animal. O LZP e o BZN, não apresentaram atividade significativa contra o parasito em 6 horas de incubação. Considerando a maior concentração testada para o LZP, considerou-se um índice de seletividade de 2,46 sendo mais ativo contra as formas metacíclicas do que as células Vero, enquanto o Benznidazol apresentou IS de 0,85 (tabela 2).

Tabela 2 - Concentração Inibitória de 50% de OXI e LZP sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* e Índice de Seletividade.

Fármaco	Concentração Inibitória – CI ₅₀	R ²	Intervalo de Confiança (95%)	Índice de Seletividade
Lansoprazol	>541 µM	Nc	Nc	2,46
Oxiconazol	279,6 µM	0,9186	85,26 a 184,8	0,16
Benznidazol	1.002,0 µM	0,7957	735,8 a 1,365	0,85

Legenda: 06 horas de incubação. R² = Coeficiente de determinação. Nc = Não calculado.

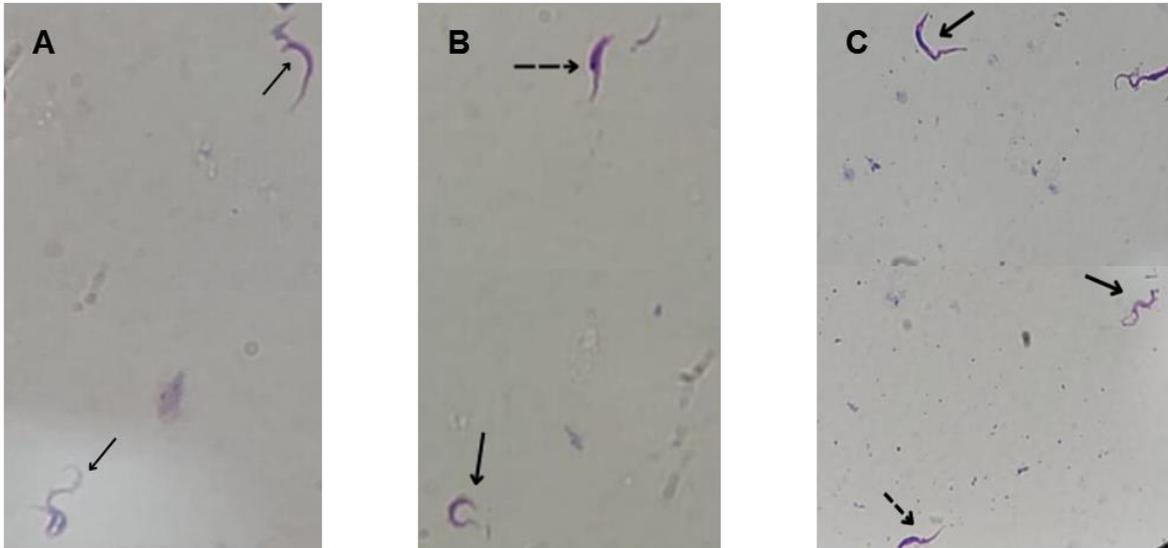
5.3 Influência da CI₅₀ dos fármacos ativos na metaciclologênese de *T. cruzi*

Para avaliar a influência sobre a metaciclologênese *in vitro*, a CI₅₀ de cada fármaco foi adicionada aos parasitos no momento do estresse nutricional(2h), etapa em que ocorre a deflagração do processo de diferenciação das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas.

Foram considerados como tripomastigotas metacíclicas parasitos que apresentavam formato e motilidade característicos de tripomastigotas e a membrana ondulante presente. Os intermediários foram classificados como parasitos que estavam alongados ou com formatos próximos à epimastigota, ou que o movimento do flagelo não se assemelhasse à tripomastigota.

Na figura 7 podemos observar as formas tripomastigotas metacíclicas e formas intermediárias de *T. cruzi* observadas após o tratamento com OXI e LZP em relação ao controle negativo.

Figura 7 - Formas tripomastigotas metacíclicas e intermediárias de *Trypanosoma cruzi* presentes nos tratamentos com OXI e LZP em relação ao controle.

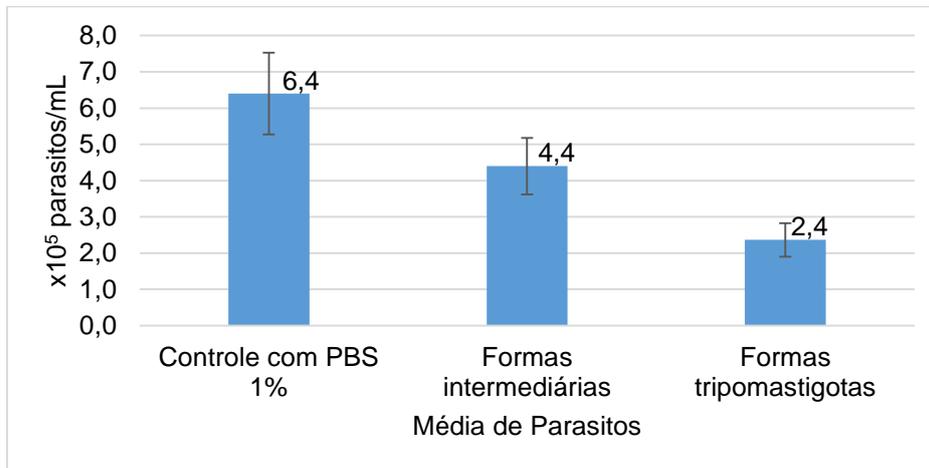


Legenda: Parasitos corados com Panótico e observados no aumento de 1.000x. As setas completas representam parasitos considerados como tripomastigotas metacíclicas e setas pontilhadas representam parasitos considerados intermediários. Em (A) parasitos no tratamento com o OXI; (B) parasitos no tratamento com LZP e (C) parasitos observados no controle negativo.

Os dados obtidos na contagem dos parasitos após as 96 horas de incubação, considerando somente os parasitos com características típicas de formas tripomastigotas metacíclicas, indicaram que o tratamento com a CI_{50} (279,6 μM) do OXI inibiu parcialmente o processo de diferenciação, em relação ao controle sem adição de fármaco.

Como pode ser observado no figura 8, do total de parasitos tratados com OXI aproximadamente 40% (37,5%) apresentaram morfologia e motilidade característicos de formas tripomastigotas metacíclicas, indicando que os mesmos concluíram o processo de diferenciação, enquanto aproximadamente 60% (62,5%) dos parasitos apresentaram morfologia e/ou motilidade sugestivas de etapas intermediárias do processo de metaciclogênese. Não foram observadas formas epimastogotas.

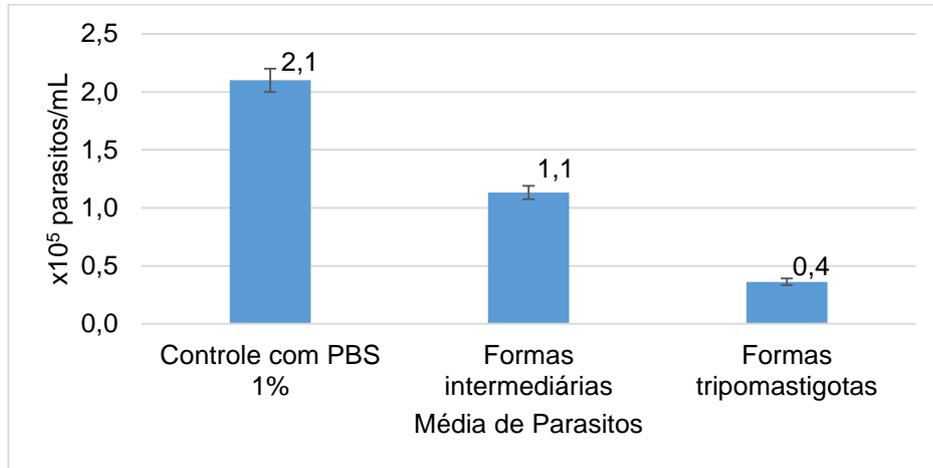
Figura 8 - Média e Desvio padrão de formas intermediárias e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* expostos à CI_{50} de OXI.



Legenda: CI_{50} : Concentração inibitória de 50%. Os parasitos foram tratados durante o estresse de 2h no processo de metaciclogênese *in vitro*.

Da mesma forma, com relação aos dados gerados nas contagens dos parasitos tratados com a CI_{50} do LZP (541,4 μ M), observou-se que o fármaco foi capaz de inibir a diferenciação, sendo que somente 24% dos parasitos apresentaram morfologia e motilidade característicos de formas tripomastigotas metacíclicas, ao passo que 76% apresentaram morfologia e/ou motilidade característicos de etapas intermediárias do processo de metaciclogênese (figura 9). Não foram observadas formas epimastigotas.

Figura 9 - Média e Desvio padrão de formas intermediárias e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* expostos à CI_{50} de LZP.



Legenda: CI_{50} : Concentração inibitória de 50%. Os parasitos foram tratados durante o estresse de 2h no processo de metaciclogênese *in vitro*.

6 DISCUSSÃO

Ambos os fármacos apresentaram efeito durante a metaciclogênese, contudo, apenas o OXI foi ativo contra as formas tripomastigotas metacíclicas. No entanto, esse fármaco apresentou valores de citotoxicidade maior que o LZP e BZN.

Há relatos sobre a toxicidade em testes *in vitro* do OXI perante células eucarióticas. Matsui *et al* (2008), testaram vários antifúngicos em timócitos de ratos e valores próximos a 100% de letalidade celular foram encontrados em tratamento com OXI, na presença de concentrações de cloreto de zinco ($ZnCl_2$), que potencializou levemente o efeito, resultado encontrado também em relação a outros antifúngicos da classe dos Imidazóis. Os autores apontam que provavelmente a estrutura dos Imidazóis ocasionem o efeito tóxico.

Shi *et al* (2022) realizaram reposicionamento do OXI contra câncer colorretal (CRC). Foram utilizadas diversas linhagens celulares de CRC e uma linhagem não cancerígena, células epiteliais do cólon humano (NCM460). A ação tóxica foi verificada nas linhagens cancerígenas com CI_{50} com valores próximos a 24,87 a 27,34 μM , mas pouca citotoxicidade encontrada em NCM460 (CI_{50} 126,4 μM). Os autores atribuíram ao fármaco a ativação da apoptose pois impede que lisossomos se fundam com autofagossomos, o que por fim desencadeia acúmulo dessas organelas levando a morte celular de CRC.

Dados do DrugBank (2023b) relatam que em um estudo de caso, a ingestão de 600mg de LZP não foi capaz de causar reações adversas significativas, além de ser seguro para gestantes, crianças e lactantes. Assim, os dados obtidos nos ensaios realizados em nosso estudo, apesar de serem *in vitro*, não demonstraram efeitos tóxicos frente às células Vero, corroborando o que é sabido sobre o fármaco.

Os fármacos utilizados nesse trabalho já foram anteriormente reposicionados para outros microrganismos. Focando na inibição de síntese de ergosterol, Gebre-Hiwot e Frommel (1993) testaram vários antifúngicos contra a forma amastigota intracelular de *L. donovani*, parasito que causa leishmaniose visceral. Dentre os medicamentos testados, o OXI apresentou melhor resultado entre os azóis utilizados,

com e dose efetiva em 50% (ED₅₀) 3,3 mg/L, enquanto que o Ketoconazol apresentou menor atividade com ED₅₀ de 170mg/L.

De Macedo-Silva *et al* (2013) avaliaram o Itraconazol (ITZ) e o Posaconazol (POSA) frente à formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, e com CI₅₀ em 72h de tratamento os valores foram de 0,08 µM e 1,63 µM respectivamente, e índices de seletividade de 187,5 µM e 12,2 µM. Ambos os fármacos inibem a 14α-demetilase e estão associados à biossíntese de ergosterol. O POSA e ITZ apresentaram efeito citotóxicos com valores próximos ao 20 µM e 15 µM respectivamente, mas perante macrófagos murinos.

O LZP e POSA foram testados contra formas amastigotas de *L. donovani*, no estudo de Gupta *et al* (2022). Os testes *in silico* demonstraram que no caso do primeiro fármaco, o alvo eram três possíveis enzimas relacionadas à ATPase transportadoras de cálcio. O estudo demonstrou que *in vitro* o provável alvo do LZP foi a ATPase do tipo P motriz de cálcio (LdBPK_352080.1) e que devido ao fato de o parasito não ser capaz de atingir internamente um ambiente ácido necessário para a formação de sulfamida, portanto, a ação observada provavelmente se deve diretamente à molécula de LZP. No caso do POSA, o alvo a 14α-demetilase.

Diferentemente de Gupta *et al* (2022), Garcia (2022) encontrou que para *T. cruzi* o alvo do LZP foi H⁺ATPase do Tipo P (TcCLB.506649.20).

OXI foi mais ativo que o LZP frente às formas tripomastigotas. À respeito do reposicionamento em *T. cruzi*, Reigada *et al* (2019), utilizaram também o antifúngico Terconazol, contra parasitos da cepa Y e Dm28c. Os valores de CI₅₀ mais baixos foram obtidos com tripomastigota e amastigota da cepa Y, com valores de 4,56 µM e 5,96 µM, respectivamente. Comparando as formas epimastigotas das duas cepas, os valores de CI₅₀ foram próximos, 25,73 µM para cepa Y e 21,94 µM para Dm28c.

Os valores obtidos em nosso estudo com OXI, frente às formas tripomastigotas da cepa Dm28c de *T. cruzi* foram maiores, indicando que esse fármaco apresenta atividade diferenciada, de acordo com a cepa de *T. cruzi*. Essa diferença dos fármacos agirem de formas diferentes entre cepas tem sido verificada por diversos autores ao estudarem diversos tipos de compostos (De Almeida *et al.*, 2021; Zingales *et al.*, 2014).

Diversas classes de fármacos foram testados contra o *T. cruzi* (Porta; Kalesh; Steel, 2023). A Sertralina, antidepressivo, alterou a integridade mitocondrial de *T. cruzi*, levando a diminuição dos níveis de ATP, tendo maior atividade contra formas amastigotas em macrófagos peritoneais (CI₅₀ 0,6 a 1,4 µM), mas também frente a tripomastigotas (CI₅₀ 0.8 a 1.8 µM) e tripomastigotas sanguíneas (CI₅₀ 5,5 a 14,2 µM) (Ferreira *et al.*, 2018).

O anti-hipertensivo Manidipino também foi testado, apresentando melhores valores de CI₅₀ 0,03 a 0.1 µM para formas amastigotas comparado a tripomastigotas (1,4 a 3,1 µM), e tendo apenas o Índice de Seletividade calculado para a forma intracelular (>1459). O mesmo causou despolarização da membrana mitocondrial ocasionando alteração na permeabilidade, o que resultou no decréscimo dos níveis de ATP (Correa; Costa-Silva; Tempone, 2021).

Durante a metaciclogênese, o OXI e LZP apresentaram atividade significativa, embora o LZP tenha apresentando atividade inferior ao OXI em relação, quando utilizado para tratamento de formas tripomastigotas metacíclicas. Em ambos os casos não foi observada a presença de formas epimastigotas no material analisado, o que indica que o processo de metaciclogênese foi ativado. O material analisado compreendeu parasitos que já haviam passado pela etapa de adesão ao substrato, onde foram mantidos durante 96h. A adesão ao substrato é essencial e necessária para que ocorra a diferenciação celular, portanto as formas analisadas correspondem à tripomastigotas metacíclicas, indicando que o processo de diferenciação foi deflagrado.

A observação de formas intermediárias, encontradas no material submetido à exposição ao OXI e LZP, em relação ao material não tratado (controle), indica que metaciclogênese foi afetada por ambos os fármacos.

No trabalho de Cardoso e Soares (2010), ao adicionarem Citral, um óleo essencial, no meio TAU comprovaram que ele não afeta a metaciclogênese, tampouco afetou a adesão do parasito, fato que pode ser a possível explicação para o OXI e LZP, já que houve a presença de intermediários e metacíclicos, considerando que a adesão de epimastigotas no substrato é essencial para que os eventos da diferenciação possam ocorrer (Figueiredo; Rosa; Soares, 2000).

Com base nos resultados obtidos, acreditamos que ambos os fármacos (OXI e LZP) não apresentam ação durante o início do processo de diferenciação, mas sim durante o mesmo, o que pode ser explicado pelo maior número de formas intermediárias, em relação ao número de formas tripomastigotas metacíclicas.

Com relação à observação de que o LZP interferiu no processo de metaciclogênese, sem no entanto apresentar atividade biológica diretamente sobre as formas totalmente diferenciadas do parasito (formas tripomastigotas metacíclicas) é possível explicar pelo fato que o possível alvo encontrado por Garcia (2022), por meio de análise *in silico*, foi a enzima H⁺ATPase do tipo P. Essa enzima pode ser encontrada nos reservossomos de formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* Scott e DoCampo (1998).

Scott e Do Campo (1998) verificaram que a atividade enzimática da H⁺ATPase do tipo P diminui à medida que o processo de diferenciação avança. Ainda, vale ressaltar que tal fato pode ser explicado pela ausência de reservossomos em formas tripomastigotas metacíclicas, uma vez que essa organela é degradada durante a diferenciação. Contudo, as formas intermediárias, durante a metaciclogênese, são capazes de realizar processos endocíticos, mas essa capacidade desaparece em formas intermediárias tardias (Cunha-e-Silva *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 1989; Vidal *et al.*, 2016).

Além disso, até o momento, três isoformas de H⁺ATPase do tipo P foram caracterizadas. TcHA1 é mais expressa nas formas epimastigotas e pode ser encontrada na membrana plasmática e em rotas endocíticas. TcHA2 é mais expressa em formas tripomastigotas e é exclusiva de reservossomos, já o TcHA3 é mais abundante em formas epimastigotas e pode ser encontrada na membrana dos reservossomos (Luo, Scott e DoCampo., 2002; Sant'Anna *et al.*, 2009).

7 CONCLUSÃO

O OXI apresentou ação superior frente às formas tripomastigotas, ao contrário do LZP e durante a metaciclogênese, os dois fármacos mostraram-se ativos, fato este que foi comprovado pela maior presença de formas intermediárias do que metacíclicas.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Sugerimos, então, a possibilidade dos fármacos trabalhados, OXI e LZP, de serem testados contra outras cepas de *T. cruzi*, e o LZP em formas amastigotas do parasito.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEVI, K. C. C. *et al.* Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 12, p. 1627, 15 dez. 2021.

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.

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. suppl_1, p. D457–D462, jan. 2010.

ÁVILA, A. R. *et al.* Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 169–177, out. 2001.

BARRADELL, L. B.; FAULDS, D.; MCTAVISH, D. Lansoprazole: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and its Therapeutic Efficacy in Acid-Related Disorders. **Drugs**, v. 44, n. 2, p. 225–250, ago. 1992.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.

BONALDO, M. C. *et al.* Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 1349–1358, abr. 1988.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue** - Brasília: Ministério da Saúde, 2004. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_transmissao_doencas_sangue.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 38 (suplemento III), 2005.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Número Especial, abr. 2021 - Doença de Chagas — Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt->

br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf/view>. Acesso em: 23 dez. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Pacto Nacional para a Eliminação da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis, Hepatite B e Doença de Chagas como Problema de Saúde Pública** - Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2022/pacto-nacional-tv-2022.pdf>>. Acesso em: 07 mar. 2024.

BRASIL. Secretaria da Saúde. Governo do Estado da Bahia. Grupo de Trabalho de Chagas - Diretoria de Vigilância. **Alerta Epidemiológico nº 11/2023 DIVEP/SUVISA/SESAB**. Disponível em:< <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2023/08/ALERTA-EPIDEMIOLOGICO-DC-11-2023.pdf>>. Acesso em 01 dez. 2023.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. *In*: DIAS, J. C. P; COURA, J. R (Orgs). **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p. 25-31.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004792, ago. 2016.

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, set. 2006.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 1026–1032, dez. 2010.

CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 533–542, maio 2010.

CAZZULO, J. J. *et al.* End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 329–343, set. 1985.

CAZZULO, J. J. Energy Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Em: AVILA, J. L.; HARRIS, J. R. (Eds.). **Intracellular Parasites**. Subcellular Biochemistry. Boston, MA: Springer US, 1992. v. 18p. 235–257.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 14 dez. 2016.

CONTRERAS, V.; MOREL, C.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 83–96, jan. 1985.

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.

CORREA, I. T. S.; DA COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G. Bioenergetics impairment of *Trypanosoma cruzi* by the antihypertensive manidipine: A drug repurposing strategy. **Acta Tropica**, v. 214, p. 105768, fev. 2021.

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

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277–282, 2 dez. 2014.

CUNHA-E-SILVA, N. *et al.* Reservosomes: multipurpose organelles? **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 325–327, set. 2006.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.

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, 28 jan. 2021.

DE MACEDO-SILVA, S. T. *et al.* *In Vitro* Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83247, 23 dez. 2013.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269–285, 1 fev. 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.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 67–124, jun. 2009.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 513–515, dez. 1984.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. DE A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, p. 375–379, jun. 2011.

DRUGBANK. **Oxiconazole**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00239>>. Acesso em: 14 dez. 2023a.

DRUGBANK. **Lansoprazole**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00448>>. Acesso em: 14 dez. 2023b.

DUDLEY, J. T.; DESHPANDE, T.; BUTTE, A. J. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. **Briefings in Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 303–311, 1 jul. 2011.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 208–218, jul. 2009.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, mar. 2019.

FERREIRA, D. D. et al. Efficacy of sertraline against *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* and *in silico* study. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 30, dez. 2018.

FERREIRA, H. D. O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 209–211, dez. 1990.

FERREIRA, I. DE L. M.; SILVA, T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 507–509, out. 2006.

FERREIRA, L. R. P. et al. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 157–166, mar. 2008.

FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. DIFFERENTIATION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* EPIMASTIGOTES: METACYCLOGENESIS AND ADHESION TO SUBSTRATE ARE TRIGGERED BY NUTRITIONAL STRESS. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213–1218, dez. 2000.

FIOCRUZ. **Organização Estrutural – Portal da Doença de Chagas**. , 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>>. Acesso em: 3 out. 2023

GALVÃO, C.; PAULA, A. S. Sistemática e evolução dos vetores. In: GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

- GARCIA, C. S. Estudo de reposicionamento de fármacos com potencial atividade contra enzimas do metabolismo de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, p. 73. 2022.
- GARCIA, E. S. et al. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 499–505, out. 2010.
- GEBRE-HIWOT, A.; FROMMEL, D. The in-vitro anti-leishmanial activity of inhibitors of ergosterol biosynthesis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 32, n. 6, p. 837–842, dez. 1993.
- GÓMEZ-OCHOA, S. A. et al. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. **Global Heart**, v. 17, n. 1, p. 59, 24 ago. 2022.
- GONÇALVES, C. S. et al. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 83, 6 fev. 2018.
- GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Experimental Parasitology**, v. 66, n. 2, p. 205–212, ago. 1988.
- 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.
- HAMEDI, A. et al. *In vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 9–18, mar. 2015.
- HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 281–296, maio 2018.
- IGLESIAS RODRÍGUEZ, I. M. et al. Analysis of the Chagas disease situation in Japan: a cross sectional study and cost-effectiveness analysis of a Chagas disease screening program. **The Lancet Regional Health: Western Pacific**, v. 31, p. 100574, 5 set. 2022.
- IRISH, A. et al. Updated Estimates and Mapping for Prevalence of Chagas Disease among Adults, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 7, p. 1313–1320, jul. 2022.
- JURBERG, J. et al. ATLAS ICONOGRÁFICO DOS TRIATOMÍNEOS DO BRASIL (VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS). 2014.

KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381–387, set. 2000.

KROPF, S. P.; LACERDA, A. L. DE; WHITTY, D. G. **Carlos Chagas, um cientista do Brasil = Carlos Chagas, scientist of Brazil**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2009.

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.

MADDEN, J. C. *et al.* A Review of *In Silico* Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 48, n. 4, p. 146–172, jul. 2020.

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.

MARCH-VILA, E. *et al.* On the Integration of *In Silico* Drug Design Methods for Drug Repurposing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.

MARTÍN-ESCOLANO, J. *et al.* An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 jun. 2022.

MATSUI, H. *et al.* Imidazole antifungals, but not triazole antifungals, increase membrane Zn²⁺ permeability in rat thymocytes Possible contribution to their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 248, n. 2–3, p. 142–150, 27 jun. 2008.

MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J.-J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 15–30, 2011.

MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–620, abr. 2007.

MCCMAHON, H. T.; GALLOP, J. L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 590–596, dez. 2005.

MEYERHOFF, A. U.S. Food and Drug Administration Approval of AmBisome (Liposomal Amphotericin B) for Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 42–48, jan. 1999.

- MICHELS, P. A. M. *et al.* Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1463–1477, dez. 2006.
- MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 64–67, 2011.
- NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 53, p. 124–144, jan. 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6th ed ed. New York: W.H. Freeman, 2013.
- 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, M. DE F. *et al.* Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 10 nov. 2008.
- OLIVEIRA, M. M.; TIMM, S. L.; COSTA, S. C. G. Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 195–199, 1 jan. 1977.
- OPPERDOES, F. R. Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 127–151, out. 1987.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 26 dez. 2023a.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Chagas disease**. 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: 26 dez. 2023b.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Menos de 10% das pessoas com Chagas recebem um diagnóstico - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2023-menos-10-das-pessoas-com-chagas-recebem-um-diagnostico>>. Acesso em: 23 dez. 2023.
- PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.
- PONTES, V. M. O. *et al.* [Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceará]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.

PORTA, E. O. J.; KALESH, K.; STEEL, P. G. Navigating drug repurposing for Chagas disease: advances, challenges, and opportunities. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1233253, 27 jul. 2023.

QUIÑONES, W. *et al.* Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 25, 31 jan. 2020.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, jun. 2012.

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

REIGADA, C. *et al.* Repurposing of terconazole as an anti *Trypanosoma cruzi* agent. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01947, 12 jun. 2019.

REZENDE, J. M. DE; RASSI, A. R. POR QUE OS TRIATOMÍNEOS SÃO CHAMADOS DE “BARBEIROS”? **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 75–83, 9 jun. 2008.

SALOMON, C. J. First Century of Chagas’ Disease: An Overview on Novel Approaches to Nifurtimox and Benznidazole Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888–894, 1 mar. 2012.

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

SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Two types of H⁺-ATPase are involved in the acidification of internal compartments in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 331, n. Pt 2, p. 583–589, 15 abr. 1998.

SHAH-SIMPSON, S. *et al.* Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006747, nov. 2017.

SHI, J. *et al.* Repurposing Oxiconazole against Colorectal Cancer via PRDX2-mediated Autophagy Arrest. **International Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 9, p. 3747–3761, 21 maio 2022.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 6, p. 845–852, mar. 2012.

SILBER, A. M. *et al.* Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 102–108, nov. 2009.

SOARES, M. J. *et al.* A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 75, n. 7, p. 522–527, 1989.

- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal Amphotericin B and Leishmaniasis: Dose and Response. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 159–166, 2010.
- TEIXEIRA, D. E. *et al.* **Atlas didático: ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2011.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, jan. 1998.
- TIELENS, A. G. M.; VAN HELLEMOND, J. J. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 10, p. 482–490, out. 2009.
- TIELENS, A. G.; VAN HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, v. 14, n. 7, p. 265–272, jul. 1998.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, maio 2001.
- URBINA, J. Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 287–295, 1 fev. 2002.
- URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 349–355, set. 1999.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, nov. 2003.
- VANHAELEN, Q. *et al.* Design of efficient computational workflows for *in silico* drug repurposing. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 210–222, fev. 2017.
- VIANNA MARTINS, A. *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, p. 45–58, mar. 2012.
- VIDAL, J. C. *et al.* Loss of the cytostome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Journal of Structural Biology**, v. 196, n. 3, p. 319–328, dez. 2016.
- WANG, Y. *et al.* Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D1031–D1041, 8 jan. 2020.
- WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. e31, out. 2009.

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.

WYMAN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 162–176, fev. 2008.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease? **Revista da Biologia**, v. 6, n. 2, p. 44–48, 2011.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 1 mar. 2012.

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.; BARTHOLOMEU, D. C. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210193, 6 maio 2022.

ZUMA, A.; BARRIAS, E.; SOUZA, W. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, 3 dez. 2020.