

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do potencial terapêutico de novos agentes tripanocidas sobre o
Trypanosoma cruzi

por

Bruno Lisboa Timm

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

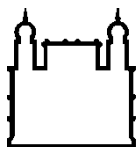
Orientadora: Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro

RIO DE JANEIRO
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ -RJ

T584 Timm, Bruno Lisboa
Avaliação do potencial terapêutico de novos agentes tripanocidas
sobre o trypanosoma cruzi / Bruno Lisboa Timm. – Rio de Janeiro, 2014.
x, 74 f. : il. ; 30 cm.
Dissertação (Mestrado)– Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2014.
Bibliografia: f. 54-72
1. Doença de chagas. 2. Quimioterapia experimental. 3. Diamidinas
aromáticas. 4. Arilimidamidas. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do potencial terapêutico de novos agentes tripanocidas sobre o
Trypanosoma cruzi

por

Bruno Lisboa Timm

Orientadora: Dra. Maria de Nazaré C. Soeiro

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Dra. Miriam Claudia de Souza Pereira (IOC/FIOCRUZ) - Revisora/Presidente

Dra. Nubia Boechat (Farmanguinhos/FIOCRUZ)

Dra. Thais Cristina Baeta Souto Padron (IMPG/UFRJ)

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC/FIOCRUZ) - Suplente

Dra. Denise da Gama Jaén Batista (IOC/FIOCRUZ) - Suplente

Rio de Janeiro, 28 de julho de 2014

Aos meus filhos Bernardo e Isabel,
que são as forças motrizes
de minha vida.

Agradecimentos

A Deus Pai todo poderoso, por me dar a graça da vida e força para enfrentar as alegrias e tristezas de viver.

A minha esposa Aline, que com sua garra e perseverança, me ajuda a ter a certeza que sempre algo melhor está por vir.

A Dra. Maria de Nazaré Soeiro, por ter me acolhido em seu grupo, pela sua compreensão pelos momentos que todos passamos e por nos transmitir seu entusiasmo e perspicácia científica, nos direcionando e nos acompanhando de uma forma bem próxima.

A Dra. Denise Gama por ter sido a pessoa que primeiro me recebeu no laboratório e me mostrou como colocar a mão na “massa”.

A Dra. Cristiane França, com sua animação contagiante, sempre nos levanta na lida do dia-a-dia.

Ao Marcos Meuser por suas mãos abençoadas e olhos de Sauron e a Patrícia Bernardino, importantíssimos não só para mim, mas para o bom funcionamento de todo o laboratório.

Ao Dr. Gabriel Oliveira e a Wanderson Batista, do Setor de Experimentação Animal que com conhecimento, habilidade e paciência, contribuíram enormemente para esta dissertação.

A todos do grupo do Laboratório de Biologia Celular, que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

Ao dropbox, e seu salvamento automático de versões anteriores, mesmo quando nos esforçamos para salvarmos uma versão anterior por cima da mais atualizada.

Ao *Plasmodium falciparum*, que por caminhos inusitados me trouxe para a Fiocruz, que de pesquisado também comecei a pesquisar.

A minha mãe, Solange Lisboa de Castro (sem o Dra. por favor!), que sempre me apoiou e me deu força em todos momentos de minha vida e que tive a imensa alegria de tê-la por perto e conhecer o seu lado “Doutora”. Muito obrigado! Não adianta...mãe é mãe!

Esta dissertação foi desenvolvida sob a orientação da Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PROEP/CNPq/Fiocruz, PDTIS, CAPES e Consortium for Parasitic Drug Development (CPDD).

Esta dissertação é composta por dois artigos:

Timm BL, Da Silva PB, Batista MM, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MNC. *In vitro* investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 2014; no prelo.

Timm BL, Da Silva PB, Batista MM, Guedes da Silva FH, Da Silva CF, Tidwell RR, Patrick DA, Kilgore Jones S, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro MNC. *In vitro* and *In vivo* biological effect of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother 2014;58(7):3720-26.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: arilimidamida

AST: aspartato aminotransferase

Bz: benzonidazol

CCC: cardiopatia chagásica crônica

CYP51:14- α -desmetilase dependente de citocromo P-450

DA: diamidina aromática

DC: doença de Chagas

DMT: dose máxima tolerada

DNDi: Drugs for Neglected Diseases Initiative

EC50: dose que reduz em 50% o número de parasitos

EROs: espécies reativas de oxigênio

HAPT: high-affinity pentamidine transport

IS: índice de seletividade

kDNA: DNA do cinetoplasto

LAFEPE: Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LAPT: low-affinity pentamidine transport

LC50: dose que reduz em 50% a viabilidade celular

Nif: nifurtimox

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de DB75, DB289 e pentamidina.....	14
Figura 2: Diferenças estruturais entre DAs (DB569) e AIAs (DB613A).....	16
Figura 3: Estrutura química da DA DB1362.....	17
Figura 4: Estruturas químicas das AIAs DB766, DB1831 e DB1852.....	18
Figura 5: Estruturas químicas de DB2242 e DB2243.....	45
Figura 6: Estruturas químicas de DB2238, DB2246 e DB2247.....	46
Figura 7: Estrutura química de 18SAB075.....	49
Figura 8: Estruturas químicas de 26SMB070 e 16SAB079.....	51

RESUMO

O tratamento etiológico disponível para a doença de Chagas, causada pelo parasito intracelular *Trypanosoma cruzi*, é baseado em dois nitroderivados, benzonidazol (Bz) e nifurtimox (Nif), ambos introduzidos empiricamente na prática clínica há mais de 40 anos. Estes fármacos são considerados insatisfatórios principalmente devido à (i) baixa eficácia, principalmente na fase crônica, (ii) efeitos colaterais importantes, e (iii) ocorrência de linhagens de parasitas resistentes. Um dos atuais desafios desta doença negligenciada é o desenvolvimento de tratamentos alternativos mais efetivos e seletivos, constituindo o objetivo principal da presente dissertação. Assim, ensaios *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos para avaliar a eficácia de diamidinas aromáticas (DAs) e arilimidamidas (AIAs), sobre *T. cruzi*. No primeiro artigo demonstramos a atividade de dez diamidinas sobre formas tripomastigotas, na faixa micromolar, sem redução significativa da viabilidade da célula hospedeira. Três DAs com anéis externos benzimidazólicos N-metilados apresentaram diferenças na atividade tripanocida, sendo o composto DB2247, com *meta*-N-metilação em ambos os anéis, o mais ativo e também o de mais rápida ação. Todavia, nenhum do compostos testados foi ativo sobre amastigotas intracelulares. No segundo artigo avaliamos atividade anti-*T. cruzi* de oito novas AIAs. Nossos dados mostram que seis destes compostos foram inativos sobre ambas formas evolutivas do parasito. As duas AIAs que apresentaram efeito sobre as formas tripomastigotas foram 18SAB075 e 16DAP005, que exibiram ainda excelente ação *in vitro* sobre formas intracelulares, com eficácia similar ao Bz. Neste sentido, o composto 18SAB075, que apresentou ótimo índice de seletividade para tripomastigotas sanguíneos (IS > 106), foi avaliado *in vivo* quanto à toxicidade aguda e eficácia. Em modelo experimental de infecção aguda com *T. cruzi*, o tratamento com 18SAB075 com doses não tóxicas (5 mg/kg por cinco dias consecutivos) reduziu em cerca de 50% os níveis parasitêmicos e apresentou 40% de proteção contra mortalidade, sendo menos efetivo do que o fármaco de referência (Bz 100 mg/kg/dia). Neste sentido, este trabalho apresenta informações relevantes sobre a atividade biológica de novos análogos aromáticos sobre *T. cruzi*, estimulando a continuidade de estudos pré-clínicos com novos agentes e derivados objetivando encontrar compostos mais seletivos para terapia da doença de Chagas.

ABSTRACT

The available etiologic treatment of Chagas disease, caused by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*, is based on two nitroderivatives, benznidazole (Bz) and Nif, both introduced empirically in the clinical practice for over 40 years ago. These drugs are considered unsatisfactory mainly due to their (i) low efficacy, mainly in the chronic phase, (ii) severe side effects, and (iii) occurrence of resistant parasite strains. One of the main challenges of this neglected disease is the development of more effective and selective therapies, which is our main objective. Thus, *in vitro* and *in vivo* studies were conducted to evaluate the efficacy of aromatic amidines (DAs) and arylimidamides (AIAs) against *T. cruzi*. In the first paper, we demonstrated the activity of ten novel diamidines at micromolar range against trypomastigotes, without significant loss in host cell viability. In this study we found that three diamidines with *N*-methylated benzimidazoles outer rings displayed different trypanocidal activities, being the compound DB2247, with meta-*N*-methylation in both rings, the most active with also a faster trypanocidal action. However, none of the diamidines were active against intracellular amastigotes. In the second paper, we evaluated the efficacy of eight novel AIAs against *T. cruzi*. Our data showed that six out of the eight studied compounds were inactive against both evolutive forms of the parasite. The only two AIAs that were active, 18SAB075 and 16DAP005, displayed outstanding *in vitro* effect with efficacy similar to that of Bz against intracellular forms. In this way, the compound 18SAB075, which had an excellent selective index for bloodstream trypomastigotes (SI > 106), was moved to *in vivo* tests for acute toxicity and parasite efficacy. In experimental model of acute *T. cruzi* infection, 18SAB075 treatment with non-toxic doses (5 mg/kg for five consecutive days) reduced in about 50% the parasitemia levels, leading to 40% protection against mortality, being, however, less effective than the reference drug (Bz at 100 mg/kg/day). In this way, the present work provides useful information regarding the biological trypanocidal activity of amidines against *T. cruzi*, stimulating the continuity of preclinical studies with novel related molecules aiming the finding of more selective compounds for Chagas disease therapy.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	vi
Índice de figuras	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Considerações gerais	2
1.2. Fases da doença de chagas	3
1.3. Transmissão	5
1.4. Parasito e ciclo de vida	8
1.5. Tratamento	10
1.6. Diamidinas aromáticas e análogos	14
2. Objetivos.....	24
3. Resultados.....	26
3.1. Artigo #1	27
3.2. Artigo #2	33
4. Discussão	41
5. Conclusões.....	52
6. Referências bibliográficas	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças tropicais negligenciadas compreendem 17 infecções parasitárias (incluindo aquelas causadas por helmintos e protozoários), virais e bacterianas, que afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo, sendo simultaneamente causa e efeito da pobreza, podendo levar à incapacidade crônica e diminuição da capacidade de trabalho. Essas doenças, entre elas a doença de Chagas, causam morbidade e mortalidade substancial entre as pessoas mais pobres do mundo, todavia, esse impacto social não foi acompanhado por um desenvolvimento expressivo de novos fármacos (Kappagoda & Ioannidis, 2012, 2014).

A doença de Chagas (DC), ou tripanosomíase americana, foi descoberta por Carlos Chagas em 1909, que além de identificar o agente etiológico e seu vetor, também descreveu o ciclo biológico do parasito, bem como diversos aspectos da patogenia e sintomatologia da doença. DC é uma enfermidade potencialmente fatal, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e que apresenta uma prevalência de 8-10 milhões de indivíduos infectados, com cerca de 14 mil óbitos por ano e aproximadamente 90 milhões de pessoas sob risco de contrair a infecção (Rassi Jr et al., 2012; OMS, 2013). A DC é um problema de saúde pública em 21 países da América Latina, com uma estimativa de 50 mil novos casos/ano desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e Chile (Moncayo & Silveira, 2009). Em áreas endêmicas, esta doença é a maior causa de cardiomiopatia e a principal responsável por morte em pacientes com doenças cardiovasculares com idade entre 30-50 anos (Rassi Jr et al., 2009, 2010). Atualmente, a DC apresenta um novo aspecto relacionado à sua expansão em países não endêmicos, na maioria das vezes resultante da migração de portadores infectados de áreas endêmicas em busca de melhores condições de vida (Coura & Dias, 2009; Schmunis & Yadon, 2010; Ortí-Lucas et al., 2014).

Embora o número de novos casos venha caindo drasticamente nos últimos 20 anos, devido principalmente a iniciativas governamentais (políticas públicas regionais e horizontais como, por exemplo, a do Cone Sul) e não-governamentais (DNDi, 2013; MSF, 2011, 2013), a DC ainda apresenta muitos desafios relacionados a: (i) sua epidemiologia peculiar, caracterizada por uma variedade de fatores de risco (grande número vetores e reservatórios potenciais, variadas formas de transmissão e diferentes isolados/cepas do parasita); (ii) falta de medidas profiláticas

e esquemas quimioterápicos eficazes, especialmente na fase crônica tardia, além de problemas de acesso aos atuais fármacos disponíveis; e (iii) falta de um melhor entendimento da fisiopatologia da evolução da doença crônica e de biomarcadores de progressão da patologia e de diagnóstico (Soeiro & De Castro, 2009).

As indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de novos quimioterápicos contra a DC devido ao longo tempo de desenvolvimento (desde ensaios pré-clínicos até ensaios clínicos e mesmo disponibilização para comercialização e uso) e tendo em vista que esta patologia afeta sobretudo populações carentes de países em desenvolvimento. Apesar de causarem 500.000 mortes/ano, entre 1975-2004 apenas 21 (1,3%) de 1556 fármacos aprovados foram desenvolvidos especificamente para doenças tropicais negligenciadas (Chirac & Torreele, 2006). Na última década, o panorama vem se modificando a partir de parcerias público-privadas que vem preenchendo algumas lacunas e diminuindo gargalos do processo de pesquisa e desenvolvimento (Chatelain & Ioset, 2011; Molyneux & Malecela, 2011).

1.2. Fases da doença de Chagas

A DC apresenta duas fases: aguda e crônica. Após a infecção, tem início a fase aguda da doença, caracterizada por parasitismo sanguíneo com duração de até 8 semanas, sendo que a grande maioria das pessoas afetadas é assintomática, podendo porém apresentar sintomas inespecíficos como febre, mal-estar e aumento de gânglios, fígado e baço (Rassi Jr et al., 2012). Nos casos mais graves, em especial, crianças menores de dois anos pode-se observar até 5% letalidade, principalmente devido à miocardite ou meningoencefalite (Rassi Jr et al., 2009; Carod-Artal, 2013). Na transmissão vetorial, o local da entrada do parasito pode ser identificado por uma lesão edematosa de pele denominada chagoma de inoculação ou então, mais especificamente, sinal de Romana quando envolve a conjuntiva ocular.

A grande maioria dos casos agudos não tratados evolui para a fase crônica indeterminada da DC, que pode perdurar por toda a vida, na qual ocorre um aparente estado de equilíbrio parasito-hospedeiro (forma indeterminada), caracterizado pela ausência de sintomas clínicos evidentes e infecção subpatente detectada por exames sorológicos (Macêdo, 1997; Ribeiro & Rocha, 1998; revisto

em Moncayo & Silveira, 2009). Todavia após longo período de latência (10-30 anos), cerca de 30% dos indivíduos evoluem para a fase crônica sintomática. As principais manifestações clínicas desta fase incluem alterações cardíacas (20-30%) e/ou digestivas (10%) (revisto em Rassi Jr et al., 2006; Moncayo & Ortiz-Yanine, 2006), podendo ocorrer também lesões neurológicas periféricas (meningoencefalite) (Rassi Jr et al., 2010, 2012). Na forma crônica digestiva, os pacientes infectados apresentam comprometimento da função do sistema digestório (alteração da secreção, motilidade e absorção) devido à destruição do plexo mioentérico, o que nos casos mais graves, ocorre o desenvolvimento de megavísceras (esôfago e cólon) (Köberle, 1956; Rezende, 1984; Meneghelli, 2004; Coura & Borges-Pereira, 2010; Bassotti & Villanacci, 2013). A forma crônica cardíaca é a manifestação clínica mais significativa, apresentando dano cardíaco progressivo, caracterizado por cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva, arritmias, tromboembolismo e morte súbita (Higuchi et al., 2003; Rassi Jr et al., 2006; Machado et al., 2012a,b). A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é microscopicamente caracterizada pela presença de infiltrados inflamatórios multifocais a difusos. Os mecanismos patológicos envolvidos na progressão na DC ainda não são plenamente compreendidos de modo que é muito difícil prever quais indivíduos irão evoluir para esta fase (Marin-Neto et al., 2009), além de existir uma grande variedade regional quanto as características da morbidade cardíaca e/ou digestiva (Coura & Dias 2009; Coura & Borges-Pereira, 2010). A patogenia da doença é caracterizada por processo inflamatório persistente, com resposta antiparasitária e/ou autoimune, associado à baixa carga parasitária (Tarleton, 2003; Higuchi et al., 2003; Rocha et al., 2007; Marin-Neto et al., 2008; Rassi et al., 2009; Lattes & Lasala, 2014).

A persistência do parasitismo na fase tardia da infecção (fase crônica) pode ser claramente demonstrada nos casos de imunossupressão nos quais a reagudização é observada em situações como transplantes (Pizzi et al., 1982; Atlas et al., 2005; Kocher et al., 2012; Guiang et al., 2013), leucemias (Kohl et al., 1982; Cohen et al., 2010) e coinfeções (ex. vírus da imunodeficiência humana) (revisto em Almeida et al., 2011). As manifestações clínicas de reativação são mais severas que na DC aguda levando ao aparecimento de formas graves associadas a manifestações cardíacas, nervosas, lesões cutâneas e, sobretudo, de comprometimento neurológico (Hemmige et al., 2012). Segundo Pinazo e colaboradores (2013), o estabelecimento de diretrizes de consenso internacional

sobre o tratamento no momento adequado contribuiria enormemente para a padronização do manejo de pacientes imunossuprimidos.

1.3. Transmissão

O *T. cruzi* é transmitido principalmente (80-90%) por vetores invertebrados hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo os parasitos liberados nas fezes/urina durante o repasto sanguíneo. Os gêneros mais importantes do ponto de vista da transmissão são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, envolvendo mais de 130 espécies, sendo que o *Triatoma infestans* (nos países do Cone Sul) e *Rhodnius prolixus* (Países Andinos e América Central) são as espécies melhor adaptadas ao domicílio (Lent & Wygodzinky, 1979). Com o desmatamento e a colonização de áreas silvestres, a infecção por *T. cruzi* inicialmente restrita a animais silvestres (roedores, marsupiais e outros mamíferos), passou a atingir também o homem e seus animais domésticos em áreas rurais. O ciclo de transmissão de *T. cruzi* envolvendo animais selvagens já existe há milhões de anos, tendo há mais de 9000 anos atrás evidências da infecção em animais domésticos e humanos (Guhl et al., 1999; Aufderheide et al., 2004; Ferreira et al., 2011). O que era antes fenômeno enzoótico primitivo, na América Latina sofreu uma evolução para uma antropozoonose generalizada com várias espécies de triatomíneos essencialmente silvestres em processos de ocupação peridomiciliar e domiciliar (Dias, 2009; Coura & Junqueira, 2012).

De um modo geral, os triatomíneos habitam durante o período diurno frestas das casas em áreas rurais e durante a noite se tornam ativos para se alimentarem. Eles costumam picar áreas exposta da pele, como a face, daí seu nome vulgar no Brasil ser “barbeiro”. Após o repasto sanguíneo, o inseto infectado elimina suas fezes/urina próximas à área da picada contendo formas infectivas do *T. cruzi* capazes ganhar acesso às células do hospedeiro através de mucosas, quando o homem leva as mãos contaminadas aos olhos ou nariz, e/ou via soluções de continuidade, como as provocadas pelo ato de coçar ou pelo orifício da picada (Rassi et al., 2010). Desde a década de 90, o programa de controle vetorial nos países do Cone Sul reduziu significativamente transmissão na região. Países da América Latina, Uruguai (1997), Chile (1999), Brasil (2006), Belize (2012) entre outras regiões endêmicas, receberam certificação da OPAS/OMS referente à

interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans* (Silveira, 2010). Exames sorológicos realizados em crianças de 0-5 anos, em 2007, indicam que a soroprevalência nessa faixa etária foi de 0%, o que pode ser interpretado como uma prova da interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil (Moncayo & Silveira, 2009). De fato, são necessários controle e vigilância constante, visando a detecção e eliminação de focos residuais, para que a interrupção se mantenha (Dias et al., 2008). Embora a transmissão esteja controlada nos países supracitados e em grande parte da Argentina, outras espécies de triatomíneos são potenciais vetores, podendo ocupar o nicho da espécie eliminada, desafiando assim, o combate à doença (Schofield et al., 2006).

A transfusão de sangue é uma via importante de transmissão. Na década de 80, o movimento migratório rural-urbano somado ao combate vetorial, tornou a transfusão sanguínea o principal modo de transmissão em países endêmicos devido ao alto percentual de doadores positivos para Chagas no Brasil e na América Latina (em torno de 3%). A obrigatoriedade da triagem sorológica imposta a quase totalidade dos países endêmicos vem reduzindo o risco de transmissão transfusional. A infecção em doadores de banco de sangue em 80-90 décadas diminuiu de 0,26%-22,47% para 0,01-8% em 2005 (Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011).

Outra forma de transmissão é por via congênita, cujo risco geral em recém-nascidos de mães infectadas é de cerca de 5%, com 15 mil casos estimados anualmente (Howard et al., 2014; Bonney, 2014) Embora os recém-nascidos infectados possam desenvolver a sintomatologia e morrerem logo após o nascimento, a maioria torna-se portadora e estará sob risco de desenvolver doença cardíaca grave ao longo de suas vidas. Mesmo que a DC seja diagnosticada durante a gravidez (a maioria das grávidas encontra-se na fase crônica indeterminada), o risco de transmissão congênita não pode ser evitado, pois devido a reações adversas e potencial risco teratogênico, o tratamento etiológico não é indicado. Entretanto, se a infecção for diagnosticada e tratada durante o primeiro ano de vida, há quase 100% de chance de cura parasitológica além de baixo risco de efeitos adversos (Buekens et al., 2008; Cevallos & Hernández, 2014; Howard et al., 2014).

A via oral de transmissão tem apresentado uma importância crescente, com surtos microepidêmico em áreas não endêmicas para DC. No Brasil, estes surtos envolvem comida, caldo de cana e água contaminados com triatomíneos infectados

ou suas fezes ou com secreções de glândula anal de marsupiais (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Gus et al., 1993; Coura, 2006; Steindel et al., 2008; revisto por Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012), levando a casos agudos graves, devido a uma infecção com alta carga parasitária. Na Colômbia e Venezuela, os surtos foram relacionados a sucos de frutas (goiaba, laranja e tangerina) provavelmente contaminados pelo inseto (Noya et al., 2010). Na região da Amazônia brasileira a infecção oral é considerada a principal forma de transmissão do *T. cruzi* envolvendo a ingestão de alimentos, como por exemplo, a polpa de açaí, contaminados com as excretas de triatomíneos infectados em áreas onde o ciclo domiciliar do triatomíneo estava sob controle (Dias et al., 2011; Andrade SG et al., 2011a; Souza-Lima et al., 2013). No período de 2000-2010, mais de mil casos agudos foram relatados em 138 surtos, principalmente na Amazônia brasileira, destes, 776 (71%) foram atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

Outras vias de transmissão são o transplante de órgão infectados e acidentes de laboratório (revisto em Herwaldt, 2001). Embora de rara ocorrência, a amamentação pode ser outra via de transmissão da doença, visto que já foi identificada a presença de formas tripomastigotas no leite de mães na fase aguda da doença (Rassi et al., 2004, Norman & López-Vélez, 2013).

Paralelamente aos grandes avanços obtidos pelos países endêmicos, a DC alcançou, via processo migratório, países não endêmicos da América do Norte e da Europa, além do Japão e Austrália, colocando em risco os receptores de sangue e transplantados destes países (Flores-Chávez et al., 2008; Jackson et al., 2010; Assal & Corbi, 2011; Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011). A falta de conhecimento por parte dos profissionais de saúde sobre a doença, suas formas de transmissão e diagnóstico pode resultar em graves consequências à saúde pública (Coura & Viñas, 2010; Hotez et al., 2013). Nos Estados Unidos, cinco indivíduos foram diagnosticados com DC transfusional desde a década de 80 e entre 2007 e 2011 foram confirmados 1459 doadores positivos em hemocentros de 43 estados, em especial Califórnia, Flórida e Texas. Baseado no número de imigrantes latino-americano e na seroprevalência presumida em seus países de origem, estima-se que 300 mil pessoas com infecção pelo *T. cruzi* vivem atualmente nos Estados Unidos (Bern et al., 2011; Parker & Sethi, 2011). Na Europa, no período 1999-2009, as estimativas são de mais de 80.000 pessoas infectadas com cerca de 4.000 casos

confirmados em laboratório (OMS, 2013), sendo os países mais afetados Espanha, Reino Unido, Itália e Suíça (Perez-Molina et al., 2011).

1.4. Parasito e ciclo de vida

O *T. cruzi* é um protozoário, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero Trypanosoma. O ciclo evolutivo do parasito envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados (mamíferos incluindo o Homem) (Deane et al., 1984). No lúmen do intestino do inseto, o parasito se prolifera como formas epimastigotas que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas na porção final do intestino. Estas formas, altamente infectivas, são eliminadas juntamente com as fezes e urina do vetor após o repasto sanguíneo no mamífero (Brack, 1968; Brener & Alvarenga, 1976). No hospedeiro vertebrado, os parasitos inicialmente infectam células presentes no sítio de inoculação, incluindo macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais; escapam do vacúolo fagolisosomal; e então finalizam o processo de diferenciação em amastigotas já livres no citoplasma da célula hospedeira, onde se multiplicam por divisão binária. Após vários ciclos reprodutivos, os parasitos sofrem novamente diferenciação para tripomastigotas que são liberados após a ruptura da célula, juntamente com amastigotas, para o espaço intercelular. Ambas formas podem por sua vez invadir células vizinhas, infectar outros órgãos e tecidos através da corrente sanguínea ou então serem ingeridos pelo inseto vetor, dando continuidade ao seu ciclo de vida (De Souza, 2002a).

De acordo com as características morfológicas, a posição relativa entre o flagelo e o núcleo, a localização da bolsa flagelar e a localização e exposição do flagelo podemos diferenciar as três formas evolutivas do *T. cruzi*: (i) tripomastigota: forma alongada (fina ou larga), com cinetoplasto pouco compactado, arredondado (forma de rede ou cesta) e localizado na região posterior ao núcleo; flagelo emergindo da bolsa flagelar, com localização lateral, aderindo ao longo do corpo do parasito, e tornando-se livre na região anterior; (ii) amastigota: forma arredondada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão, anterior ao núcleo, flagelo curto que emerge da bolsa flagelar; (iii) epimastigota: forma alongada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão localizado anteriormente ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar com abertura lateral, e percorre aderido a parte do corpo do parasito, tornando-se livre na região anterior.

Além de organelas características de células eucarióticas, o *T. cruzi* apresenta outras (algumas presentes também em outros parasitos da família *Trypanosomatidae*) que podem representar interessantes alvos para o desenho de novos fármacos (De Souza, 2002b), como a sua mitocôndria única e altamente ramificada, além de acidocalcisomos e glicosomos.

Os tripanosomatídeos apresentam mitocôndria única que se ramifica por todo corpo do protozoário (Paulin, 1975), apresentando cristas típicas, além de enzimas comuns aos eucariotos (Meirelles & De Souza, 1980). Em região especializada da mitocôndria, próxima ao corpúsculo basal, há uma zona densa caracterizada por uma maior concentração de DNA, dando origem a uma estrutura intramitocondrial chamada de cinetoplasto, onde se encontra aproximadamente 20-30% do DNA total da célula (De Souza, 2009). O DNA do cinetoplasto (kDNA) é peculiar em sua estrutura, função e modo de replicação sendo constituído por uma rede de DNA composta por milhares de minicírculos e dezenas de maxicírculos interconectados (Shapiro & Englund, 1995).

O acidocalcisoma é uma organela eletrodensa, de caráter ácido, composta por membrana única e contendo grandes quantidades de Ca^{2+} , que está presente em tripanosomatídeos e em outros protozoários patogênicos, como *Plasmodium berghei* e *Toxoplasma gondii*. Estas estruturas apresentam também grandes quantidades de orto-, piro- e polifosfato complexado com sódio, potássio, magnésio, cálcio, zinco e ferro além de aminoácidos. A acidificação da organela e a captação de cálcio são mediadas ATPases (revisto em Docampo & Moreno, 2011; Docampo et al., 2013). Os acidocalcisomas participam da osmorregulação e estão associados ao complexo do vacúolo contrátil que é constituído por um conjunto de túbulos e vesículas localizado próximo à bolsa flagelar. Em condições hipoosmóticas, ocorre a fusão dos acidocalcisomos com este complexo e a translocação de aquaporina e sob a ação de exopolifosfatases ocorre a transferência de fosfato e cátions. O gradiente osmótico gerado no vacúolo contrátil sequestra a água, com o auxílio da aquaporina, que é subseqüentemente ejetada na bolsa flagelar contribuindo para a regulação da homeostasia (Docampo et al., 2011).

O glicosomo é uma organela típica de tripanosomatídeos semelhante a peroxisomos encontrados nas demais células eucarióticas. Ela se apresenta de forma esférica, envolvido por membrana única, com matriz densa e homogênea, estando presente em todas as formas evolutivas de *T. cruzi* (De Souza, 2009). Uma

das principais características é a presença das sete primeiras enzimas da via glicolítica, que abrange por 90% do conteúdo proteico desta organela (Michels et al., 2006), além de enzimas do metabolismo de purinas e pirimidina e da via das pentoses (Penha et al., 2009). Em *T. brucei*, como hexoquinase e a fosfofrutoquinase não apresentam regulação alostérica, propôs-se que a compartimentalização seria um modo de proteger da acumulação de intermediários. De fato, a inibição do transporte de enzimas glicolíticas para os glicossomos exerce um efeito deletério profundo sobre o parasito (Haanstra et al., 2008).

1.5. Tratamento

A partir da década de 50, diferentes séries de compostos foram testados sem êxito em portadores de DC e, somente a partir da década de 60 surgiram dois fármacos no mercado para tratamento desta patologia: os nitroderivados nifurtimox (Nif) e Bz.

Nif é um nitrofurano desenvolvido pela Bayer e comercializado como Lampit® a partir de 1967, mas que teve sua produção descontinuada na década de 80. Atualmente, Nif voltou a ser produzido pela Bayer HealthCare em El Salvador, visando utilização no tratamento combinado com eflornitina para tripanosomíase africana (Jannin & Villa, 2007). O mecanismo de ação de Nif envolve redução nitroredutases e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (revisto em Docampo & Moreno, 1986). O *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxificação para metabólitos de oxigênio, apresentando basicamente o sistema tripanotiona/tripanonotona redutase (TR), exclusivo de tripanosomatídeos, e baixa atividade da superóxido dismutase; sendo deste modo mais sensível a EROs que a célula hospedeira, (revisto em Maya et al., 2007). Os efeitos colaterais mais frequentes com Nif incluem anorexia, perda de peso, excitabilidade psíquica ou sonolência e manifestações digestivas.

Bz é um nitroimidazol desenvolvido pela Roche em 1972 e comercializado como Rochagan® ou Radanil®. Em 2003 a Roche iniciou processo de transferência de tecnologia do Bz para o governo brasileiro ficando o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) responsável pela sua produção (Jannin & Villa, 2007). Até 2011, toda a sua produção foi realizada utilizando o princípio ativo fabricado pela Roche, quando então, a empresa brasileira Nortec Química passou a

ser a responsável. Todavia, produção da matéria prima não foi suficiente e houve uma interrupção no fornecimento do princípio ativo (MSF, 2011; Manne et al., 2012). No ano seguinte o LAFEPE retomou a produção e distribuição do Bz e em parceria com DNDi, desenvolveu uma formulação pediátrica do medicamento (Lafepe, 2012; DNDi, 2013). O último avanço nesta área é a produção do medicamento na Argentina, comercializado como Abarax®, através de um esforço conjunto do Ministério da Saúde argentino, do laboratório ELEA e da ONG Fundación Mundo Sano, também do mesmo país (MSF, 2013).

O dano oxidativo no *T. cruzi* foi descartado como principal mecanismo de ação de Bz, pois em concentrações em que o nitroderivado apresentava atividade tripanocida não ocorria estímulo da geração de íon superóxido e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Moreno et al., 1982). A ação deste composto sobre o parasito parece estar relacionada ao dano causado pela adição covalente de produtos intermediários da nitroredução (radicais livres e metabólitos eletrofílicos) a macromoléculas (Polak & Richle, 1978; Diaz de Toranzo et al., 1988; Docampo, 1990; Maya et al., 2007). Bz é ativo sobre a forma intracelular do *T. cruzi*, assim como sobre tripomastigotas sanguíneos. Os efeitos colaterais mais graves com o Bz estão principalmente relacionados quando a dose cumulativa total alcança 18 g (Cançado, 2002). As manifestações mais comuns são: dermatite por hipersensibilidade e intolerância digestiva, podendo também ocorrer: depressão da medula óssea (neutropenia, agranulocitose e trombocitopenia), polineurites e toxicidade hepática (Viotti et al., 2009).

Nif e Bz são efetivos na fase aguda e crônica recente da doença, no entanto, mostram pouca eficácia em infecções crônicas (Coura & Borges-Pereira, 2010). De modo geral os resultados foram considerados satisfatórios no tratamento de casos agudos e crônicos recentes da doença principalmente em crianças, estimando-se uma cura parasitológica em até 80% (Cançado, 1999, 2002), indicando-se então o tratamento de todos os doentes em fase aguda ou na reagudização em pacientes crônicos (Andrade et al., 1996; Cançado, 1997; Sosa Estani et al., 1998; Rassi et al., 2000). Apesar da maioria dos estudos revelar uma baixa eficácia destes fármacos durante a terapia de pacientes crônicos tardios, vários estudos estão demonstrando os benefícios do tratamento com Bz em animais experimentais e em portadores crônicos, reduzindo o parasitismo e a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), assim como aumentando o número de negativas sorológicas

(Garcia et al., 2005; revisto em Viotti et al., 2006). No entanto, a cura parasitológica dos pacientes tratados, avaliada por métodos parasitológicos como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), fica em torno de 20% (Garcia et al., 2005; Martins et al., 2008; Fernandes et al., 2009).

O tratamento de pacientes na fase crônica da doença ainda é motivo de discussão, apesar dos resultados alcançados até o momento no projeto BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) e de dados clínicos de outros grupos no Brasil (Rassi et al., 2000; Cançado, 2002) e Argentina (Viotti et al., 2006) apontarem que o tratamento tenha um impacto positivo sobre a inibição da evolução clínica da CCC (revisto em Marin-Neto et al., 2009, Machado-de-Assis et al., 2013; Viotti et al., 2014). Assim, a recomendação de tratamento em portadores crônicos na fase tardia (em especial os sintomáticos) não é um consenso e deve ser avaliado caso a caso (Andrade et al., 2011).

Além da controvérsia do uso de nifurtimox e Bz para o tratamento de portadores crônicos, estes compostos apresentam eficácia variável na fase aguda, de acordo com a idade do paciente, estando também relacionada à área geográfica, principalmente devido a diferenças na susceptibilidade dos estoques do *T. cruzi* (Filardi & Brener, 1987; Murta & Romanha, 1998). Além disso, estes compostos apresentam efeitos colaterais, podendo levar ao abandono do tratamento e/ou internação dos pacientes (Coura & De Castro, 2002; Rassi Jr et al., 2009). Devido às limitações do tratamento da DC, esforços contínuos tem sido realizados na busca por novos fármacos que possam substituir ou ser administradas em combinação com Nif e Bz.

Desta forma, diversas vias metabólicas do parasito têm sido investigadas como possíveis alvos terapêuticos. Alvos moleculares em *T. cruzi* considerados promissores para o desenho de novos fármacos incluem as enzimas hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Wenck et al., 2004), cisteína proteases (Sajid et al., 2011), topoisomerases (Zuma et al., 2011), 14- α -desmetilase dependente de citocromo P-450 (CYP51) (revisto por Buckner, 2008), esqualeno sintase (Urbina, 2002; Sealey-Cardona et al., 2007), farnesil pirofosfato sintase (Szajnman et al., 2005), farnesil transferase (Hucke et al., 2005; Kraus et al., 2009) e dihidrofolato redutase (Schormann et al., 2010). A combinação de diferentes compostos visando uma maior eficácia e menor toxicidade também é uma estratégia terapêutica usada com frequência (Coura, 2009).

Alguns exemplos de compostos em fase pré-clínica são o fexinidazol, um derivado 5-nitroimidazólico redescoberto pela DNDi e que também está em estudo clínico de fase II/III para o tratamento da tripanosomíase africana (Bahia et al., 2012), análogos de diamidinas (Soeiro et al., 2013a), oxaborol (Bustamente et al., 2014) e inibidores da CYP51 como o fenarimol (Keenan et al., 2013) e o N-1-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etil)-4-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamida (VNI) (Soeiro et al., 2013b). Ainda, a vinilsulfona K777, inibidora da protease cruzaina, tem mostrado eficácia em modelo murino de infecção por *T. cruzi* e se encontra em fase de testes pré-clínicos (McKerrow et al., 2009).

Em 2011, três ensaios clínicos de fase II foram iniciados com o uso de dois azoles inibidores da CYP51: o posaconazol (um análogo estrutural do itraconazol) e o E1224, uma pró-fármaco do ravuconazol. Ambos são derivados triazólicos que inibem CYP51 (Urbina, 2009). Dois estudos clínicos foram feitos com posaconazol, STOP-CHAGAS (em Argentina, Colômbia, México e Venezuela) com resultados esperados até 2014 e CHAGASAZOL (Barcelona, Espanha) finalizado em Março 2013 (resultados não postados em <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01162967>, até o dia 14 de maio de 2014). O outro estudo usando o composto E1224 (DNDi/Eisai Pharmaceuticals), foi realizado na Bolívia. Dados ainda não publicados revelaram altas taxas de falha terapêutica de ambos azoles após 12 meses de seguimento dos portadores tratados e avaliados pela técnica de PCR. Além disso, outras desvantagens dos derivados azólicos, como o posaconazol, são alto custo, complexidade de produção e ocorrência de resistência (Urbina, 2009; Lepesheva et al., 2010, 2013).

De acordo com a OMS e o DNDi, as características essenciais necessárias para um novo agente anti-*T. cruzi* incluem: (a) alta atividade contra tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares; (b) alta atividade contra diversas cepas do parasito; (c) atividade comprovada nas fases aguda e crônica da doença; (d) tratamento por administração oral e preferencialmente com poucas doses; (e) baixa toxicidade ao paciente, sendo o medicamento disponível a crianças, adultos e mulheres em fase reprodutiva; e (f) estabilidade (resistência a variações de temperatura, por exemplo) e baixo custo de produção e comercialização (Nwaka & Hudson, 2006).

1.6. Diamidinas aromáticas e análogos

Diamidinas aromáticas (DAs), que tem como protótipo a pentamidina (Fig. 1), representam uma importante classe de compostos utilizados em abordagens terapêuticas contra tumores e apresentando também excelente atividade contra diversos patógenos. DAs foram inicialmente testadas em *T. brucei* e desde então sua ação tem sido avaliadas em diversas infecções parasitárias (revisto em Soeiro et al., 2005). Atualmente, a pentamidina é utilizada na clínica para o tratamento de leishmanioses, da tripanosomíase africana e durante o tratamento de pneumonias causadas por *P. jiroveci*, em especial em pacientes imunossuprimidos (revisto em Werbovetz, 2006). No entanto, apesar de sua comprovada atividade antiparasitária, esta DA apresenta biodisponibilidade oral limitada, devido ao valor elevado de pKa atribuído ao grupamento funcional amidínico ($\text{RC}(=\text{NH})\text{NH}_2$), além de poder induzir efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e diabetes. Neste sentido, muitos análogos e derivados foram sintetizados e testados *in vitro* e *in vivo* com objetivo de aprimorar sua seletividade e propriedades farmacológicas (Werbovetz, 2006; Wilson et al., 2008, Wang et al., 2010). Na última década, a pafuramidina (DB289), um pró-fármaco da furamidina (DB75) (Fig. 1) administrada por via oral, demonstrou eficácia contra da tripanosomíase africana em ensaio clínico de fase III. Todavia, o ensaio clínico estendido de segurança (fase I) evidenciou nefrotoxicidade tardia levando à interrupção de todo estudo (Paine et al., 2010).

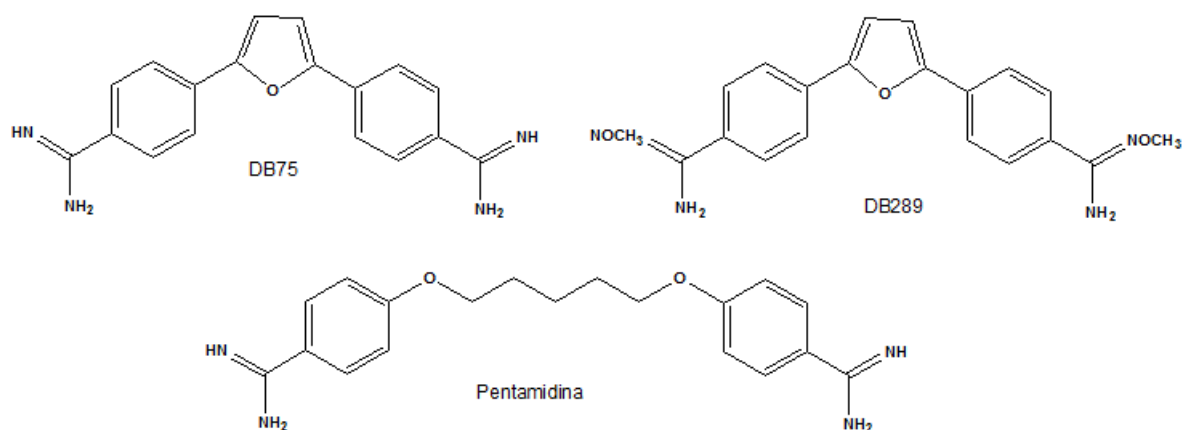


Figura 1: Estruturas químicas de DB75, DB289 e pentamidina.

DAs clássicas formam complexos - não covalentes e não intercalantes - com a fenda menor do DNA em sequências ricas em A-T, sendo capazes de induzir

alterações em sua organização e topologia (Wilson et al., 2008). Esta característica representa um importante alvo de ação tripanocida, devido ao grande conteúdo de adenina e timina no kDNA. No entanto, estudos têm demonstrado que a DB75 é também capaz de se associar com regiões ricas em G-C, apesar de forma menos frequente e menos intensa (Bailly et al., 2005). Devido à propriedade fluorescente desta classe de compostos, é possível acompanhar sua distribuição por microscopia de fluorescência além de avaliar seu efeito ultraestrutural em parasitos através da análise por microscopia eletrônica de transmissão. De fato, dados demonstraram não só acúmulo, mas também alterações significativas no núcleo e na mitocôndria de diferentes tripanosomatídeos (Lanteri et al., 2006; Mathis et al., 2006, 2007; Batista et al., 2010a,b). Entretanto, a ligação ao DNA pode ser apenas uma etapa inicial do mecanismo de ação, seguida de alterações topológicas que poderiam levar a instabilidade e destruição do DNA, bem como a alterações na interação DNA-proteína, e consequente inibição da transcrição e/ou da replicação (Soeiro et al., 2009). De fato, não há uma correlação direta entre o grau de interação ao DNA e a atividade tripanocida em diamidinas (Mathis et al., 2007; Daliry et al., 2009). A natureza catiônica da pentamidina permite seu acúmulo na mitocôndria, podendo levar ao colapso do potencial da membrana mitocondrial, resultando na sua permeabilização e ativação da morte celular por apoptose (Soeiro et al., 2005; Werbovetz, 2006; De Souza et al. 2006). Em estudos com *L. mexicana* foi observado que em cepas resistentes à pentamidina, apesar do fármaco atravessar a membrana plasmática, ela não se acumula eficientemente na mitocôndria não favorecendo ligação ao kDNA (Basselin, 2002).

Assim, apesar do esforço de muitos grupos de pesquisa, não foi possível estabelecer um único mecanismo para a atividade antiparasitária da diamidinas, tendo sido sugeridos diferentes alvos, como DNA nuclear e mitocondrial, microtúbulos, acidocalcisomas, inibição de proteases, polimerases, proteína quinase e da síntese de fosfolípidios, além de distúrbios no metabolismo de poliaminas (Soeiro et al., 2005; Werbovetz, 2006; Mathis et al., 2006; revisto em Soeiro et al., 2013a).

Neste contexto, o Laboratório de Biologia Celular em colaboração com grupos de química medicinal, como os Drs. David Boykin (Georgia State University, Georgia, EUA) e Richard Tidwell (University of North Carolina, North Carolina, EUA), tem obtido interessantes resultados em estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados à ação

anti-*T. cruzi* de diamidinas. Dentre esta classe de compostos se destacam as arilimidamidas (AIAs) que apresentam expressiva atividade contra diversos microorganismos incluindo *Leishmania sp.* (Stephens et al., 2003; Wang et al., 2010; Zhu et al., 2012), *Neospora caninum* (Debache et al., 2011; Schorer et al., 2012), *Besnoitia besnoiti* (Cortes et al., 2011) e *Echinococcus multilocularis* (Stadelmann et al., 2011). AIAs - anteriormente denominadas amidinas reversas - diferem das diamidinas, por apresentarem o grupamento amidina (RC(=NH)NH₂) ligada ao núcleo aromático da molécula através de um átomo de nitrogênio, ao invés de estar ligado por um átomo de carbono (Fig. 2).

Com valores menores de pKa (~7) e maior lipofilicidade em comparação com diamidinas clássicas como pentamidina e DB75, as AIAs apresentam atividade superior (>200x) sobre formas intracelulares de *Leishmania* devido ao aumento da permeabilidade (Rosypal et al., 2008; Wang et al., 2010).

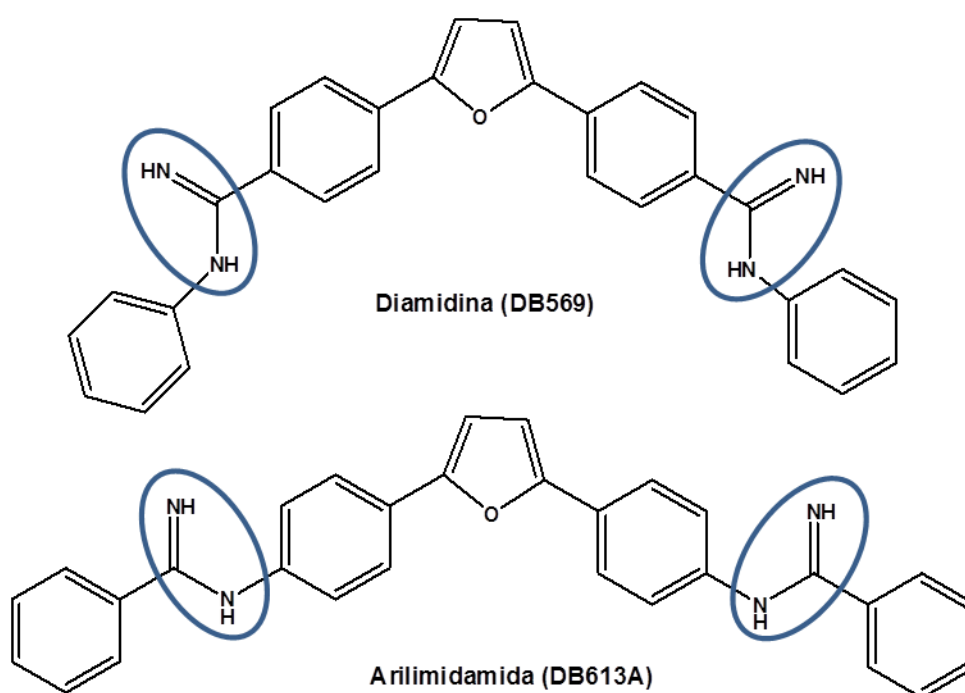


Figura 2: Diferenças estruturais entre DAs (DB569) e AIAs (DB613A)

Em nosso laboratório foi observado que enquanto a pentamidina apresenta baixa atividade *in vitro* sobre tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (EC₅₀ > 32 μM), outras DAs são ativas na faixa do submicromolar (De Souza et al., 2004; Pacheco et

al., 2009; Batista et al., 2010a,b; Daliry et al., 2011). Entre as DAs, temos a DB75, uma bis-amidina difernilfurânica comumente referida como furamidina, ativa sobre uma gama de microorganismos patogênicos (Tidwell & Boykin, 2003). Em nosso laboratório foi estudada a atividade tripanocida e leishmanicida de DB75 e seu análogo fenil substituído DB569, ambos com propriedades similares de ligação ao DNA. DB569 foi significativamente mais potente que a DB75 sobre formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares. Por microscopia de fluorescência foi observado que ambas as diamidinas se localizam principalmente no núcleo da célula hospedeira e no núcleo e cinetoplasto do parasito e, por microscopia eletrônica, mostrou importantes alterações na morfologia destas duas organelas (De Souza et al., 2004). Em ensaios *in vivo*, DB569 (i) reduziu parcialmente a mortalidade dos animais infectados e tratados, (ii) baixou os níveis de creatinina e aminotransferase, demonstrando um papel de proteção na lesões hepáticas e renais induzidas pela infecção, (iii) diminuiu significativamente a carga parasitária cardíaca, prevenindo alterações cardíacas elétricas e, (iv) reduziu os níveis de linfócitos TCD8+ no coração de animais infectados em relação tanto ao grupo apenas infectado quanto ao infectado e tratado com Bz (De Souza et al., 2007). Uma outra DA analisada foi a DB1362 (Fig. 3), uma diamidina do tipo diariltiofeno apresentou valor de EC₅₀ de 6,6 µM e proporcionou redução parcial (40%) dos níveis de parasitemia em modelo experimental de infecção aguda de camundongos infectados com *T. cruzi* cepa Y (Da Silva et al., 2008).

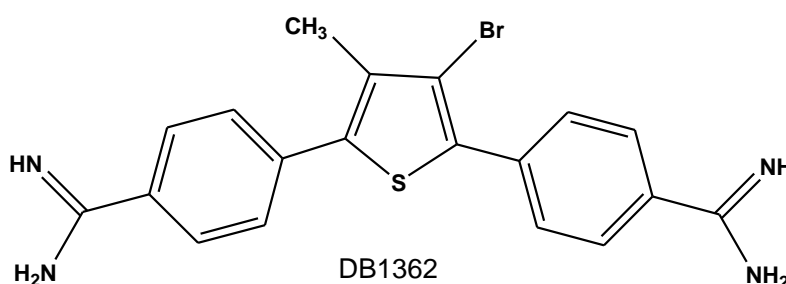


Figura 3: Estrutura química da DA DB1362

Estudos com AIAs mostraram a elevada atividade biológica contra *T. cruzi* de uma série de análogos, em especial a DB745, DB766, DB1831 e DB1852 (Fig. 4), que apresentaram maior eficácia que as diamidinas pentamidina e furamidina e da substância química de referência, como o Bz (De Souza et al., 2004; Da Silva et al., 2007; Pacheco et al., 2009).

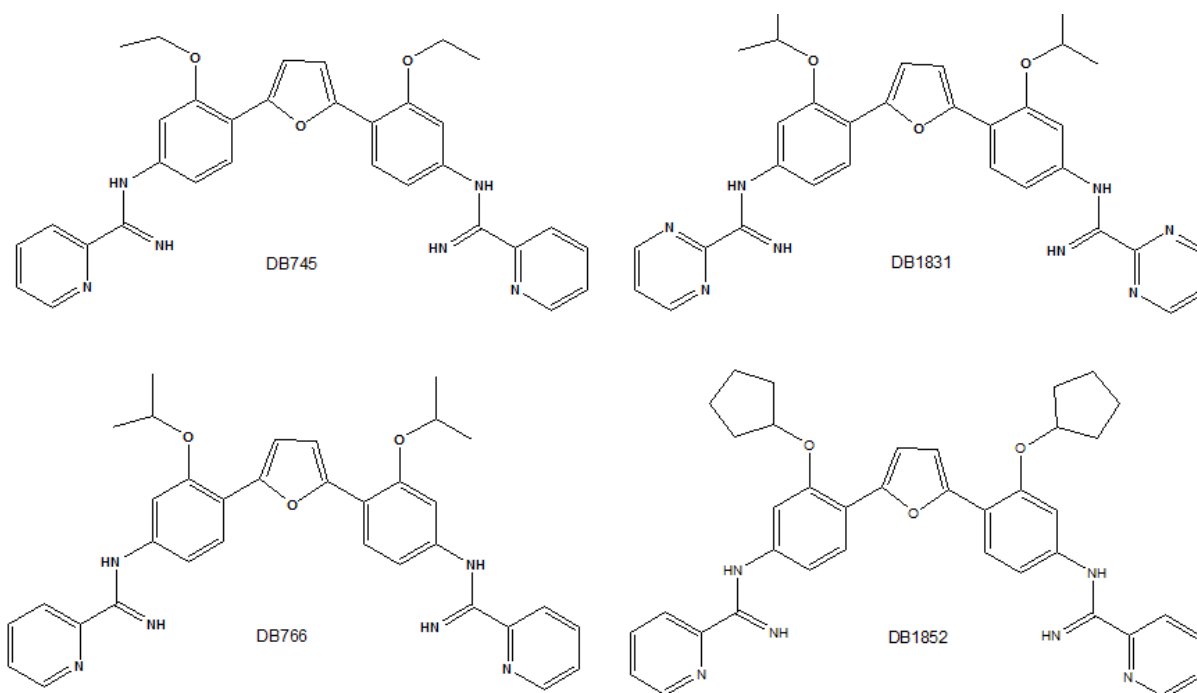
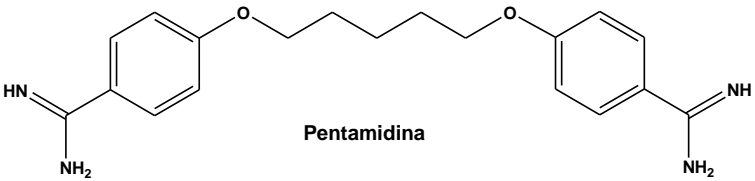
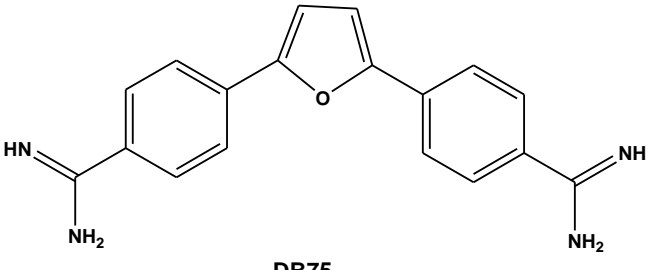
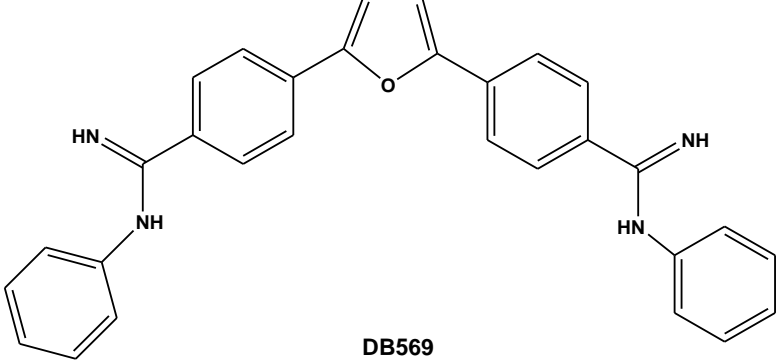
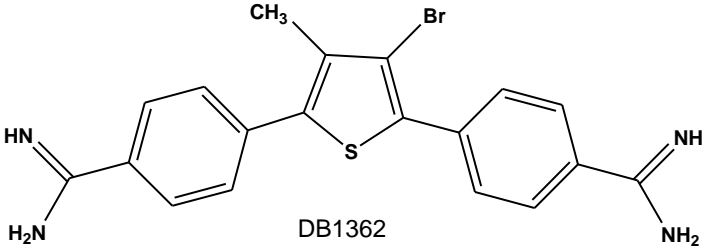


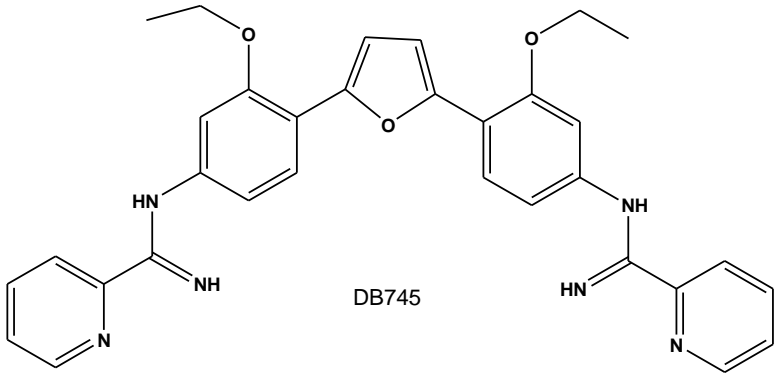
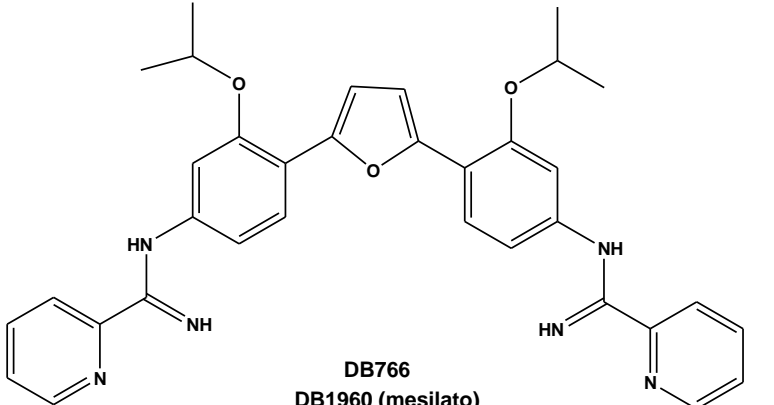
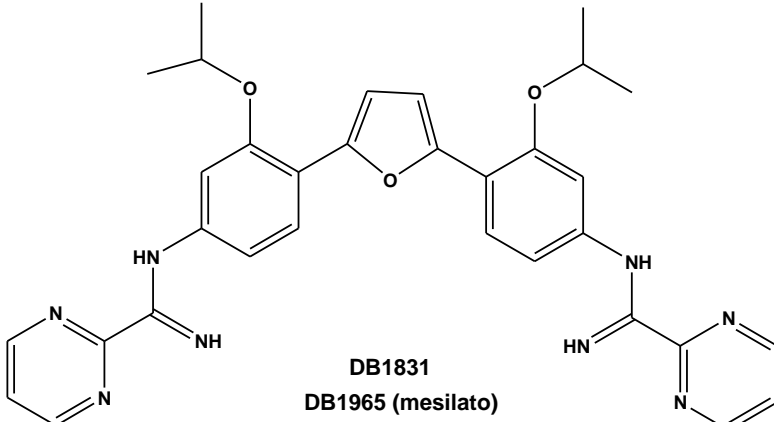
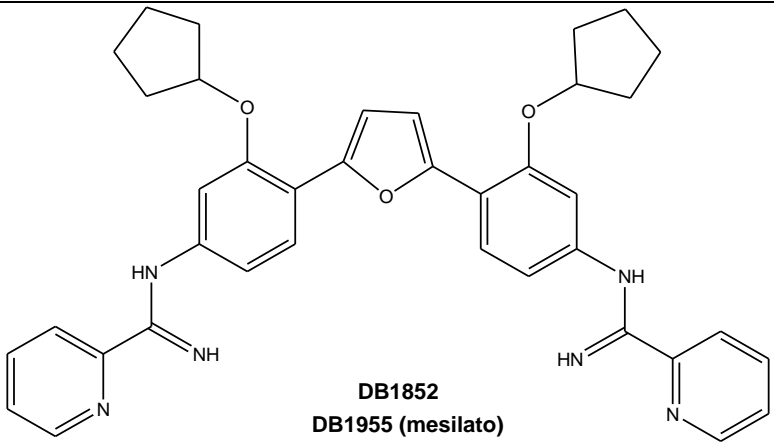
Figura 4: Estruturas químicas das AIAs DB745, DB766, DB1831 e DB1852.

A DB766 apresentou uma atividade muito superior (>260x) ($EC_{50} = 60$ nM, Batista et al., 2010a) em relação a DB75 ($EC_{50} = 16000$ nM, De Souza et al 2007) sobre formas sanguíneas de *T. cruzi* (Tabela 1). Em estudos com uma série de análogos relacionados, foi observado que pequenas modificações na estrutura química são capazes de aumentar a seletividade e a eficácia, o que pode ser explicado, como acima citado, pela maior lipofilicidade destes análogos, assim como pelos menores valores de pKa das AIAs, facilitando sua passagem através de membranas celulares. Estas características são de fato muito desejáveis para um novo fármaco, especialmente na fase crônica da DC, permitindo atravessar as membranas das células do hospedeiro e do parasito, e alcançar o(s) alvo(s) no parasito. Em formas amastigotas, a DB766 apresenta atividade em concentrações nanomolares ($EC_{50} = 25$ nM) e elevada seletividade ($IS > 424$), apresentando efeitos importantes em diferentes cepas isoladas de vetores e marsupiais presentes em ciclos peridomiciliares e silvestres de diferentes regiões do Brasil além daquelas naturalmente resistentes a Bz e Nif (Colombiana e YuYu) (Batista et al., 2010a). Algumas AIAs como DB745, DB766 e DB1831 mantém a atividade a 4°C na presença de 96% de sangue, apresentando atividade superior (>30x) que a violeta de genciana, a substância química de referência para quimioprofilaxia em bolsa de

sangue (Batista et al., 2010a, 2011; Da Silva et al., 2011a, 2012). Estes resultados demonstram a potencial aplicação na profilaxia da transmissão transfusional da DC, o que é de fato outra atual e importante demanda.

Tabela 1: Atividade de DAs e AIAs sobre formas tripomastigotas cepa Y

Composto	EC ₅₀ /24h (μM)	Referência
 <p style="text-align: center;">Pentamidina</p>	> 32	De Souza et al., 2004
 <p style="text-align: center;">DB75</p>	16	De Souza et al 2007
 <p style="text-align: center;">DB569</p>	2,2	De Souza et al., 2004
 <p style="text-align: center;">DB1362</p>	6,6	Da Silva et al., 2008

 <p style="text-align: center;">DB745</p>	0,015	Da Silva et al., 2011b
 <p style="text-align: center;">DB766 DB1960 (mesilato)</p>	0,060	Batista et al., 2010a
 <p style="text-align: center;">DB1831 DB1965 (mesilato)</p>	0,020	Da Silva et al., 2012
 <p style="text-align: center;">DB1852 DB1955 (mesilato)</p>	0,060	Da Silva et al., 2011a

Análises *in vivo* da DB766, demonstraram supressão da parasitemia e do parasitismo cardíaco em camundongos, demonstrando eficácia similar ao Bz sobre infecção pelas cepas Y e Colombiana. Utilizando o esquema terapêutico de até 50 mg/kg/dia (10 dias, via intraperitoneal) houve 100% de sobrevivência dos animais (Batista et al., 2010a). Entretanto, apesar dos excelentes resultados, não se verificou cura parasitológica, avaliada por hemocultivo e PCR, o que também não foi observado com Bz (Batista et al., 2011).

De um modo geral as AIAs são sintetizadas na forma de cloridratos e apresentam baixa solubilidade, inviabilizando a administração por via oral. Uma forma de contornar este problema é síntese na forma de sais mesilados (CH_3SO_3^-). A forma mesilada da DB766, a DB1960, quando administrada por via oral (100 mg/kg/dia por 5 dias) foi capaz de reduzir a parasitemia em apenas 46% o que pode estar relacionada ao seu menor acúmulo no coração e plasma, importantes alvos de infecção e inflamação no curso desta infecção parasitária (Zhu et al., 2012).

Outra AIA extremamente ativa *in vitro* foi a DB1852, que apresentou EC_{50} no valor de 60 nM sobre formas tripomastigotas da cepa Y (Da Silva et al., 2011a). Quando avaliada *in vivo*, seu análogo mesilado, a DB1955 não levou à redução significativa da parasitemia (Zhu et al., 2012). A semelhança do que foi observado com a DB1960, é possível que o aumento da solubilização da DB1955 com a mesilação, possa ter reduzido a permeabilidade e, portanto levando a um menor acúmulo do composto nos órgãos alvo da infecção pelo *T. cruzi* (em especial tecidos musculares - como coração), resultando em baixa eficácia *in vivo* (Soeiro et al., 2013a).

Outro ponto que vale ressaltar é a diferença nas atividades das AIAs sobre as diferentes formas de *T. cruzi*. Enquanto DB766, DB1955 e DB1852 apresentam efeitos similares sobre tripomastigotas sanguíneas (EC_{50} = 60-70 nM), a primeira AIA é muito mais potente sobre formas intracelulares (EC_{50} = 25 nM, 180 nM, 538 nM para DB766, DB1955 e DB1852, respectivamente). Embora a correlação direta entre o efeito *in vitro* e *in vivo* nem sempre seja observada, resultados acumulados no nosso laboratório assim como por outros grupos sugerem que a atividade sobre amastigotas intracelulares - que são as formas reprodutivas no hospedeiro vertebrado - é um determinante mais confiável na seleção de compostos para a passagem para ensaios *in vivo* (De Castro et al., 2011).

A excelente atividade da DB766 motivou o desenho e a síntese de novos compostos relacionados, como por exemplo, a DB1831 (Da Silva et al., 2012). Esta AIA demonstrou formidável atividade sobre tripomastigotas sanguíneos ($EC_{50} = 20$ nM) e, assim como a DB766, manteve esta atividade a 4 °C em presença de sangue de camundongo. Quando avaliada sobre amastigotas interiorizadas em culturas de célula cardíaca, a DB1831 apresentou EC_{50} de 5 nM. Devido à baixa solubilidade desta AIA, em ensaios subsequentes *in vivo*, foi utilizada a sua forma mesilada, a DB1965. A administração de DB1965 por via i.p. por 5 dias consecutivos a partir do início da parasitemia, suprimiu os níveis parasitêmicos em 93 e 99% nas doses de 12,5 e 25 mg/kg/dia, respectivamente. Realizando o tratamento com a dose de 12,5 mg/kg/dia por 10 dias foi observada supressão (>99%) da parasitemia e sobrevida de > 90% dos animais, à semelhança do Bz. Porém, períodos mais longos de tratamento não foram utilizados devido à hiperatividade (reversível) observada nos animais. Em ensaio subsequente, a 5 mg/kg/dia DB1965 foi combinada com a dose sub-ótima de Bz (50 mg/kg/dia) e os animais foram tratados por 20 dias consecutivos (Da Silva et al., 2012), o mesmo protocolo usado anteriormente na combinação do Bz com DB766 (Batista et al., 2011). No entanto, a terapia combinada por 20 dias não resultou em altas taxas de cura terapêutica assim como também não foi observada pelo uso do fármaco de referência na dose ótima (100 mg/kg/dia). Com relação à toxicidade, vale ressaltar que a DB1965 apresentou menor tolerabilidade em relação a DB766 (Da Silva et al., 2012).

O uso combinado de compostos representa uma alternativa terapêutica para se potencializar o tratamento e reduzir os efeitos adversos. Todavia, apesar da expectativa de efeitos promissores na associação de AIAs e Bz, nenhuma induziu cura parasitológica (Batista et al., 2011; Da Silva et al., 2012), possivelmente devido ao protocolo altamente estridente/rigoroso (camundongos machos, apenas 20 dias de tratamento iniciado logo após a confirmação da parasitemia). De fato, estudos anteriores realizados em modelo murino de infecção por *T. cruzi*, que relataram altos percentuais de cura parasitológico, realizaram protocolos diferentes utilizando fêmeas (o macho é mais sensível a infecção) (De Souza et al., 2001), períodos mais longos de tratamento (≥ 40 dias) ou utilizando esquema abortivo (iniciando o tratamento 24 h após a inoculação os parasitas) (Urbina et al., 1998; Molina et al., 2000; Bustamante et al., 2008).

Visto que a diferença estrutural entre DB766 e DB1965 (forma mesilada de DB1831) (Fig. 4) refere-se ao grupamento terminal, piridina (1 átomo de nitrogênio no anel benzênico) e pirimidina (2 nitrogênios) respectivamente, as diferenças na toxicidade e eficácia entre essas duas AIAs podem ser atribuídas a esta pequena modificação. Assim, novos estudos são necessários para compreender este efeito, permitindo o desenho de novas AIAs contendo estes grupamentos, que são importantes para a atividade sobre *T. cruzi*.

Quando outros candidatos a fármacos anti-*T. cruzi*, como ravuconazol e o inibidor de protease K777 (McKerrow et al., 2009), são comparados com DB766 ($EC_{50} = 25$ nM) (Batista et al., 2010a), eficácia similar é verificada sobre amastigotas intracelulares e semelhante índices de supressão de parasitemia *in vivo*, o que justifica a continuidade dos estudos com novas AIAs sobre a infecção parasitária envolvendo microrganismos intracelulares (Soeiro & De Castro, 2009). Assim, os resultados alcançados pelo nosso grupo sustentam testes *in vitro* e *in vivo* sobre o potencial antiparasitário de novos análogos de amidinas, incluindo AIAs, visando a identificação de potenciais agentes anti-*T. cruzi*, objeto da presente dissertação.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar através de estudos pré-clínicos a ação de novas amidinas aromáticas sobre a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar a toxicidade *in vitro* de novos análogos de amidinas aromáticas sobre células de mamíferos (cardiomiócitos de cultivo primário).
- ✓ Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de novas amidinas aromáticas e análogos sobre tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, comparando-as com a substância química de referência (benzonidazol).
- ✓ Determinar a janela terapêutica dos compostos testados *in vitro* através do cálculo do índice de seletividade (razão entre valores de LC₅₀ e EC₅₀) visando subsequente análise *in vivo*.
- ✓ Analisar o efeito tóxico e atividade tripanocida de análogos de amidinas aromáticas com elevado índice de seletividade em modelo murino de infecção experimental pelo *T. cruzi*.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo #1

Timm BL, Da Silva PB, Batista MM, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MNC.
In vitro investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 2014, no prelo.

Estado do conhecimento quando da concepção do trabalho:

- Diamidinas aromáticas apresentam excelente atividade sobre tripanosomatídeos.

Questões propostas:

1. Avaliar a atividade antiparasitária, toxicidade e seletividade *in vitro* de 10 novas diamidinas sobre tripomastigotas sanguíneas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.
2. Correlacionar a estrutura com a atividade das dez diamidinas estudadas.

3.2. Artigo #2

Timm BL, Da Silva PB, Batista MM, Guedes da Silva FH, Da Silva CF, Tidwell RR, Patrick DA, Kilgore Jones S, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro MNC *In vitro* and *In vivo* biological effect of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(7):3720-3726.

Estado do conhecimento quando da concepção do trabalho:

- Arilimidamidas são análogos de diamidinas aromáticas com excelente atividade sobre tripanosomatídeos.

Questões propostas:

1. Avaliar a atividade antiparasitária, toxicidade e seletividade *in vitro* de 8 novas arilimidamidas sobre tripomastigotas sanguíneas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*
2. Correlacionar a estrutura com a atividade das oito arilimidamidas estudadas.
3. Avaliar a toxicidade aguda e a eficácia *in vivo* da AIA 18SAB075, comparando com o fármaco de referência, Bz, através do uso de modelo experimental de infecção aguda sobre *T. cruzi*.

4. DISCUSSÃO

Após mais de um século de sua descoberta, a doença de Chagas (DC) ainda representa um grande problema de saúde pública resultando em perdas econômicas de 1,2 bilhões de dólares/ano, afetando 10% dos 100 milhões de indivíduos mais pobres da América Latina (Lee et al., 2013). O *T. cruzi* está presente nas Américas há milhares de anos, muito antes da colonização humana, apresentando uma grande variedade de vetores e reservatórios, de modo que uma eventual erradicação da DC seria impossível, pois envolveria a eliminação de mais de 100 espécies de animais e 150 espécies de triatomíneos (Coura, 2013). Portanto, o que podemos desejar é o controle da transmissão (vetorial domiciliar e oral, via transfusional, vertical e por transplantes) pela manutenção de políticas de vigilância em saúde, educação e controle epidemiológico, além da oferta de tratamentos mais eficazes, especialmente para fase crônica desta doença, e de acesso universal.

De fato, nas últimas décadas o controle vetorial e transfusional da DC diminuiu significativamente o número de novas infecções, através de políticas públicas regionais e horizontais coordenadas na América Latina, como por exemplo, as Iniciativas do Cone Sul e o Pacto Andino, que tiveram por principais objetivos a eliminação de vetores domésticos (pelo tratamento químico e melhoramento de moradias), triagem sorológica de doadores de sangue, diagnóstico e tratamento da transmissão congênita e de todos os casos agudos (Bonney, 2014). A interrupção da transmissão vetorial foi certificada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em diversos países da América Latina, incluindo no Brasil, em 2006 (OPAS, 2014).

Além da necessária manutenção de vigilância entomológica, a alteração do quadro epidemiológico no Brasil associado à transmissão por alimentos contaminados com as fezes do *T. cruzi*, demanda um novo modelo de vigilância baseado na detecção rápida de casos agudos e surtos na Amazônia Legal, e que possa ser feita juntamente com a vigilância epidemiológica da malária, por exemplo. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em 2012 foram notificados 168 casos no Brasil, com 142 casos apenas no estado do Pará. Se incluirmos os casos em que a via de transmissão é ignorada, a transmissão por via oral pode chegar a representar mais de 90% dos casos (MS, 2014).

O uso do Bz encontra-se atualmente em uma mudança de paradigma, pois além da recomendação pela OMS e Ministério da Saúde do Brasil de tratamento de todos os casos agudos e crônicos recentes (idade até 15 anos), há evidências de

prognóstico positivo no tratamento da DC crônica tardia (Viotti et., 2014). Além disso, desde 2012, importantes avanços foram obtidos na cadeia logística do Bz: (i) sua maior disponibilidade após uma escassez global e total por mais de um ano de sua produção e liberação, muito embora ainda sejam insuficientes para tratamento da totalidade de portadores diagnosticados, (ii) o anúncio de novas formulações pediátricas (no Brasil pela LAFEPE e na Argentina pela ELEA e Mundo Sano), e (iii) sua inclusão na Lista de Medicamentos Essenciais para crianças da OMS (Dias et al., 2014). O acesso à medicação ainda permanece um desafio, pois diferentemente do Brasil, vários países não possuem um serviço de saúde universalizado e gratuito. No México, onde há uma prevalência de mais de 1 milhão de indivíduos infectados, estima-se que menos 0,5% receberam tratamento (Manne et al., 2013). A confluência de uma doença com uma longa fase assintomática, sintomas clínicos que não são claramente percebidos como consequência da infecção e que afetam populações marginalizadas resultou em uma silenciosa crise de saúde pública (Gascon et al., 2014).

Ao longo das últimas décadas, desde introdução do Bz e do Nif na clínica médica, observou-se atraso considerável na identificação de novos fármacos para o tratamento da DC, possivelmente devido: (i) ao conceito anterior equivocado de que na fase crônica o parasitismo estava ausente e que não havia relação entre parasito e a patologia da DC (teoria autoimune), desta forma não indicando o tratamento etiológico, (ii) a falta de investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico (DT) nessa área e, ausência de (iii) de protocolos padronizados e reprodutíveis (Romanha et al., 2010). Em 2012, o financiamento global para pesquisa e DT em DC foi de cerca de 32 milhões de dólares, representado meramente 1% de todo montante gasto em doenças negligenciadas, principalmente através de financiamento público (Soeiro et al., 2009; Gascon et al., 2014).

As limitações do tratamento atual da DC requerem a procura por novos fármacos que possam substituir Bz e Nif e/ou que possam ser administradas em combinação com estes nitroderivados. Mesmo com o grande número de novas classes de compostos testados em estratégias baseadas em alvos celulares e moleculares e mesmo reposicionamento de velhos fármacos, até o momento, não dispomos de alternativas à terapêutica atual da DC. Também é importante considerar que mesmo que uma triagem por ensaios automatizados (high-throughput) de bibliotecas de compostos permita identificar compostos líderes,

modelos *in vitro* padronizados com células íntegras associados a modelos *in vivo* são fundamentais para a caracterização fenotípica de atividade biológica de novas moléculas de fato promissoras (Don & Ioset, 2014).

Desde a identificação da atividade da pentamidina sobre a tripanosomiase africana, as DAs tem sido reconhecidas como agentes antiparasitários promissores, apresentando efeitos marcantes contra uma gama de agentes patogênicos que causam patologias negligenciadas, provavelmente devido a afinidade desta classe de compostos por regiões do DNA enriquecidas em bases A-T, abundantes por exemplo, no kDNA de tripanosomatídeos e no núcleo de *Plasmodium* (Soeiro et al., 2009). Todavia devido à baixa biodisponibilidade por via oral e aos efeitos adversos associados a pentamidina e a outras amidinas clássicas, novos análogos tem sido sintetizados e avaliados em sistemas *in vitro* e *in vivo* (Soeiro et al., 2013a). Em *T. brucei* já foram testadas mais de 2000 diamidinas, das quais cerca de 500 apresentaram EC₅₀ abaixo de 200 nM e seletividade *in vitro* acima de 1000 (Mäser et al., 2012). Em *T. cruzi*, DAs como DB569 e DB1362, avaliadas por nosso grupo apresentaram atividade *in vitro* na faixa micromolar (2,2 e 6,6 µM, respectivamente). Ensaio *in vivo* demonstraram um parcial papel protetor destes compostos pela redução dos níveis de carga parasitária e proteção contra a mortalidade (De Souza et al., 2006; Da Silva et al., 2008)

Entre os compostos relacionados os análogos das DAs, as AIAs se destacam pela superior atividade sobre diferentes parasitas intracelulares (Soeiro et al., 2013a). Dados publicados pelo nosso grupo demonstram que em *T. cruzi*, as AIAs como DB766, DB745, DB1831 e DB1852 apresentam efeito antiparasitário superior às DAs e ao Bz (Da Silva et al., 2007, 2012; Pacheco et al., 2009; Batista et al., 2010a,b, 2011) e como as DAs clássicas, também se ligam a fenda menor do DNA (Chai et al., 2014). Neste contexto, na presente dissertação tivemos por objetivo explorar a ação tripanocida de novos derivados amidínicos com atividade *in vitro* e *in vivo* sobre o *T. cruzi*, e que possam ser identificados como compostos líderes e candidatos para o tratamento etiológico da doença de Chagas.

No **Artigo #1**, a atividade de 10 novos compostos amidínicos sintetizados pelo grupo do Dr. Boykin (Georgia State University/USA) foi avaliada sobre as duas formas de *T. cruzi* relevantes à infecção no hospedeiro vertebrado: formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares além de avaliar a toxicidade sobre células de mamífero. Os compostos estudados podem ser divididos em dois

grupos de amidinas: (a) pequenas benzamidinas (DB2242, DB2243, DB2248, DB2249 e DB2250) e (b) grandes moléculas benzimidazólicas (DB2238, DB2239, DB2240, DB2246 e DB2247).

Em relação às pequenas benzamidinas, observamos nos ensaios com *T. cruzi* que a DB2242 e a DB2243 (Fig. 5), ambas análogas da furamidina (DB75) (Fig. 1) que possui espaçador do tipo furano, foram inativas sobre as duas formas do parasito. Comparadas a DB75, que apresenta modesta atividade sobre tripomastigotas (De Souza et al., 2004), a substituição por espaçadores do tipo uréia cíclica aboliu completamente a atividade de DB2242 e DB2243. As outras três amidinas deste grupo, que apresentam espaçadores do tipo anel pirrólico (DB2248, DB2249 e DB2250) mostraram atividade superior ao Bz, exibindo valores de EC_{50} entre 4,0-6,4 μ M para formas sanguíneas após 24 h de incubação.

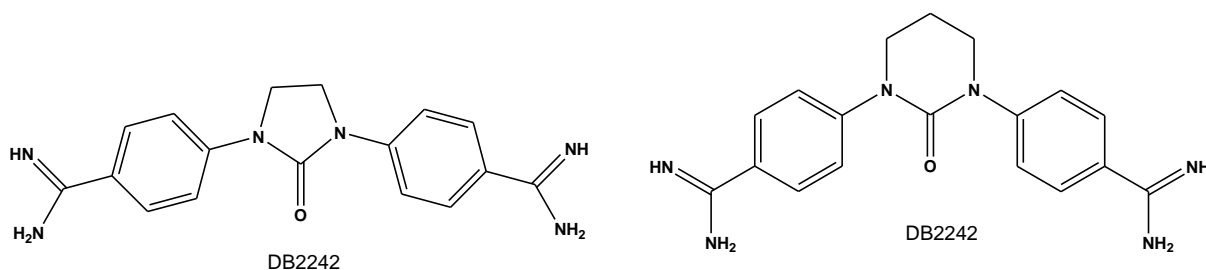


Figura 5: Estruturas químicas de DB2242 e DB2243.

Em relação à atividade das amidinas benzimidazólicas grandes sobre tripomastigotas sanguíneos, com exceção de DB2238 (EC_{50} = 18,3 μ M), todas foram mais ativas que o Bz, resultando em valores de EC_{50} entre 2,4 e 8,1 μ M após 24 h de incubação. É interessante observar que entre duas amidinas isoméricas (DB2238 e DB2246) (Fig. 5) foram observadas diferenças de cerca de 3 vezes na atividade sobre tripomastigotas, sendo que aquela com o grupo *N*-metila na posição *meta* do grupo amidina (DB2246) foi a mais efetiva. O composto mais ativo foi o DB2247 que apresenta anéis terminais contendo grupos *N*-metil na posição *meta* (EC_{50} de 2,4 μ M para formas sanguíneas e 13,7 μ M para intracelulares), sendo cerca de 2,5x mais ativo que o DB2246, seu análogo mono-*N*-metilado.

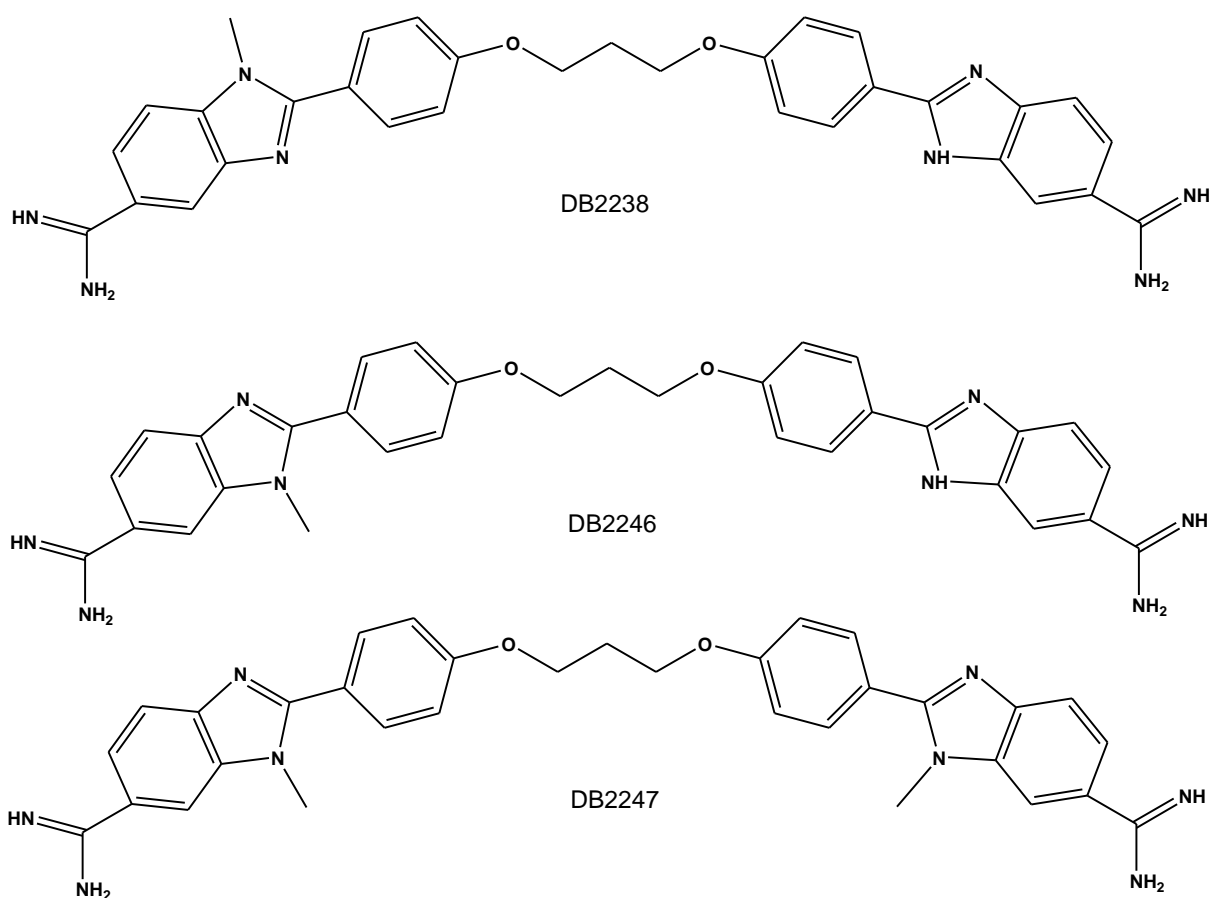


Figura 6: Estruturas químicas de DB2238, DB2246 e DB2247.

As 10 diamidinas foram então ensaiadas sobre formas amastigotas da cepa Tulahuen transfectada com o gene da β -galactosidase, o que permite a avaliação da atividade por método colorimétrico. Como resultado, cinco compostos (DB2238, DB2239, DB2242, DB2243 e DB2246) foram inativos ($EC_{50} > 32 \mu M$). Os demais compostos, incluindo a DB2247 que havia sido o mais eficaz sobre tripomastigotas, apresentaram modesta atividade após 96 h de incubação com valores de EC_{50} variando entre 12,3 e 24,2 μM . A diamidina mais ativa contra as formas intracelulares (DB2250) foi cerca de 5x menos ativa do que o fármaco de referência.

A partir da avaliação dos valores de EC_{50} , os resultados do **Artigo #1** demonstraram diferenças quanto à susceptibilidade entre parasitas intracelulares e tripomastigotas sanguíneos, sendo este último mais sensível aos compostos

estudados e corroborando dados prévios do grupo (De Souza et al., 2011; Pacheco et al., 2009; Batista et al., 2009, 2010b). Esta diferença nos perfis de susceptibilidade entre as duas formas do parasita pode refletir (a) distintos mecanismos de captação/extrusão e/ou (b) diferentes mecanismos de ação sobre a forma flagelada não proliferativa e a forma proliferativa intracelular (c) o uso de cepas diferentes (Y para formas sanguíneas e Tulahuen para intracelulares) (Soeiro et al., 2013a). As DAs são moléculas altamente básicas com valores de pKa próximos a 11, de forma que em pH fisiológico encontram-se protonadas, não sendo capazes de se difundirem livremente através de membranas biológicas, por isso estes compostos devem ser substratos de transportadores (Ward et al., 2011). A pentamidina e outras diamidinas, como DB75, são internalizadas ativamente em *T. brucei* por meio de transportadores de purinas P2 e também por HAPT e LAPT (Lanteri et al., 2006). Em *T. cruzi*, ainda não foram descritos os mecanismos de transporte para esta classe de compostos, todavia alguns representantes destes compostos catiônicos são observados não somente no núcleo e cinetoplasto do parasito como também no núcleo da célula hospedeira confirmando a habilidade em atravessar a membrana plasmática de células de mamíferos como cardiomiócitos, e de alcançar o ambiente intracelular no qual se encontra as formas intracelulares do *T. cruzi*. A procura por transportadores de DAs em *T. cruzi* é um interessante tópico a ser estudado podendo ser útil na compreensão dos diferentes perfis de suscetibilidade não só das diferentes formas evolutivas, mas também de diferentes cepas.

Vale ressaltar que a análise de toxicidade *in vitro* utilizando culturas primárias de células cardíacas representa um excelente modelo experimental haja vista que o coração é um dos principais alvos não somente de infecção mas também de inflamação decorrente da infecção pelo *T. cruzi* (Henriques-Pons & Gomes, 2013). Soma-se ainda o fato de que o estudo sobre estas células também permite avaliar o potencial de cardiotoxicidade do composto, que é uma característica não desejável para um novo fármaco para DC já que a cardiomiopatia é uma das principais manifestações desta patologia. A análise *in vitro* por microscopia ótica e os ensaios com AlamarBlue demonstraram um baixo potencial citotóxico dos compostos estudados, visto que até a concentração de 96 μ M não foi observada perda de viabilidade das células cardíacas. Apesar de DB2247 apresentar índice de seletividade superior a 40 e ser pelo menos 6x mais ativo mais efetivo que Bz sobre tripomastigotas sanguíneos, este composto foi menos ativo sobre formas

intracelulares quando comparado ao Bz, indicando que não é um bom candidato para fase crônica da DC. Todavia, a DB2247 age de forma bastante rápida apresentando considerável atividade ($EC_{50} = 3,0 \mu\text{M}$) com apenas 2 horas de incubação com formas sanguíneas, sendo cerca de 30x mais ativa do que o fármaco de referência. Esta rápida atividade é uma característica desejável para intervenções imediatas em situações agudas tais como reativação da infecção por *T. cruzi* devido a condições de imunossupressão. O conjunto de nossos resultados deste primeiro artigo sugere que o grupamento meta N-metil-amidina seja importante para a atividade da série de benzimidazóis e que deve ser levado em consideração na síntese de outros análogos. De fato, alguns compostos desta subclasse de diamidinas apresentou atividade na faixa nanomolar em *T. brucei* (Ismail et al., 2004), em Babesia (Nehrbass-Stuedli et al., 2011) além de considerável atividade antifúngica (Del Poeta, 1998)

No **Artigo #2**, a atividade de oito novas AIAs sintetizadas pelo grupo do Dr. Tidwell (North Caroline University/USA) foi estudada. Estes compostos apresentam variações estruturais, incluindo sete diferentes espaçadores entre os grupamentos amidínicos e três diferentes anéis aromáticos externos. Estas AIAs foram inicialmente avaliadas *in vitro*, sendo que duas delas, 18SAB075 e 16DAP002 apresentaram excelente atividade sobre tripomastigotas e amastigotas.

Observamos que após duas horas de incubação, ambas AIAs exibiram atividade superior (>10x) ao Bz. Após 24 h, 18SAB075 apresentou valores de EC_{50} na faixa submicromolar ($0,3 \mu\text{M}$). Quando testadas sobre as formas intracelulares do parasito, utilizamos como primeiro filtro, o ensaio colorimétrico de revelação da infecção de culturas de células L929 pela cepa Tulahuen transfectada com β -galactosidase segundo protocolo descrito na nota técnica de Romanha e colaboradores (2010). Os testes conduzidos com a concentração fixa de $1 \mu\text{g/ml}$ revelou que as duas AIAS mais ativas foram as mais efetivas sobre formas sanguíneas: 18SAB075 e 16DAP002, alcançando índices de inibição da infecção na ordem de 50%. A seguir, foram determinados os valores de EC_{50} das duas AIAs através de ensaios utilizando concentrações crescentes dos compostos, resultando em valores de EC_{50} na faixa micromolar, muito próximo ao valor do fármaco de referência ($EC_{50}=1,5 \mu\text{M}$, $4,1\mu\text{M}$ e $2.6\mu\text{M}$ para 18SAB075, 16DAP002 e Bz respectivamente). A promissora atividade da 18SAB075 em amastigotas também foi confirmada quando avaliada sobre a cepa Y ($EC_{50} = 0.9 \mu\text{M}$). Estas duas AIAs foram

mais ativas que o conjunto de diamidinas investigadas no **Artigo #1**. AIAs diferem de outros análogos amidínicos por apresentarem um átomo de nitrogênio intermediando a associação do grupo imino ao anel arila (Stephens et al., 2001, 2003; Rosypal et al., 2008). Como discutido em estudos prévios (Soeiro et al., 2013a), a superior atividade das AIAs em relação a diamidinas pode estar relacionada a estas pequenas diferenças estruturais, pois a não exposição direta dos grupamentos catiônicos presentes na extremidade da molécula, resulta em menores valores de pKa, e portanto, um caráter mais hidrofóbico que as diamidinas clássicas que possuem valores de pKa próximos a 10 (Arafa et al., 2005). Esta particularidade estrutural das AIAs contribui para sua captação e internalização mais eficiente através de membranas biológicas de células hospedeiras e dos parasitos (Mathis et al., 2007; Richard e Werbovetz, 2010).

No **Artigo #2**, o composto mais ativo, 18SAB075 (Fig. 6), contém um grupo difenilacetileno acoplado, com uma conjugação estendida. O segundo composto, 16DAP002, contém um sistema carbazol como espaçador, o qual também oferece uma maior conjugação, porém com uma conformação mais rígida devido aos anéis fundidos. O derivado xilênico 26SMB070, que foi menos ativo, contém um anel aromático no seu espaçador, mas os átomos de nitrogênio estão ligados a carbonos alifáticos, não aromáticos.

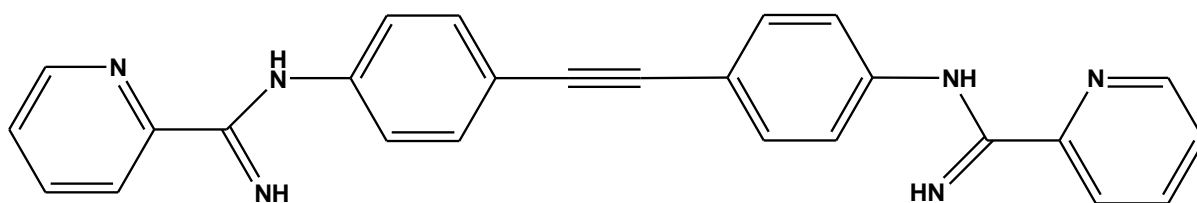


Figura 7: Estrutura química de 18SAB075.

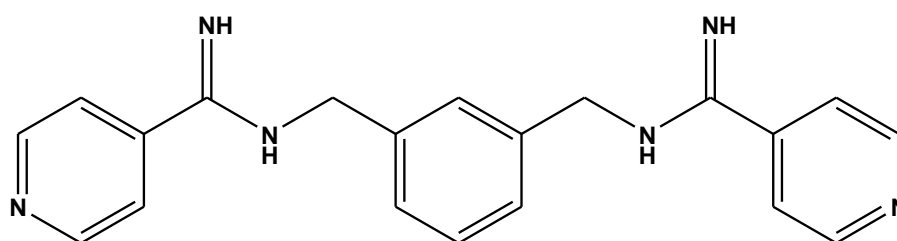
Os compostos 18SAB075 e 16DAP002 foram efetivos sobre diferentes cepas do parasito (Y e Tulahuen) e devido ao alto índice de seletividade da 18SAB075 (IS > 106), esta AIA foi selecionada para ensaios *in vivo*.

De modo a determinar a dose máxima tolerada (DMT), realizamos ensaios de toxicidade aguda. A monitoração de sinais de toxicidade aguda ocorreu por até 48 h após administração de doses crescentes do composto por via intraperitoneal e oral (gavagem) utilizando fêmeas e machos de camundongos suíço. Até a dose de 50

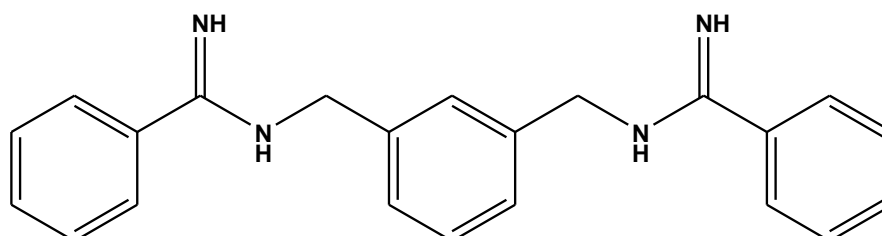
mg/kg não foram observadas alterações nos animais, enquanto as doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram efeito adversos como ataxia, hiperatividade e tremores. A análise patológica confirmou que a dose mais elevada de 200 mg/kg induziu sinais de reatividade hepática, e que foram corroborados pelo aumento nos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST). A seguir análise da eficácia *in vivo* sobre a infecção pelo *T. cruzi* foi explorada utilizando apenas doses inferiores ou iguais a 20 mg/kg/dia, nunca excedendo a dose cumulativa de 50 mg/kg, visando evitar a geração de toxicidade nos animais tratados. Em paralelo, Bz foi incluído no estudos como fármaco de referência sendo administrado na dose de 100 mg/kg/dia.

Assim, avaliamos a eficácia da AIA (administração por via i.p.) sobre o modelo de infecção aguda de *T. cruzi*, utilizando camundongos machos suíços infectados com a cepa Y. Nossos dados mostraram que em todos os esquemas terapêuticos ensaiados (2 e 5 dias de tratamento, consecutivos, com início a partir da positividade da parasitemia) usando doses não tóxicas, a 18SAB075 não mostrou eficácia *in vivo* enquanto o Bz que não somente suprimiu a parasitemia, como também induziu 100% de proteção contra a mortalidade como anteriormente descrito (Soeiro et al., 2013b). Porém, sob as mesmas condições de estrigência do modelo experimental, resultados prévios utilizando bis-AIAs do tipo piridilamidina - DB766 (Batista et al., 2010) e um análogo relacionado, a DB1831 (Da Silva et al., 2012) demonstraram excelente atividade *in vivo* nestes modelos de infecção aguda por *T. cruzi*, exibindo atividade similar a Bz, o que sugere que a presença de grupamentos tipo pirimidina e piridina nos grupamentos terminais das bis-AIAs possam ser importantes para atividade tripanocida *in vivo*. Dados recentes do grupo (De Araujo et al., 2014) confirmam essa evidência, visto que apesar de algumas AIAs (que não possuem nitrogênio nos anéis aromáticos terminais) apresentarem excelente atividade *in vitro* na faixa de nanomolar, não foram ativos como o Bz em ensaios de infecção *in vivo*, no que se refere à redução da parasitemia e proteção contra mortalidade.

No **Artigo #2**, a fraca atividade em amastigotas observada pela AIA 26SMB070 foi ainda mais reduzida com a substituição do anel piridil pelo anel benzênico no análogo 16SAB079 (Fig. 7).



26SMB070



16SAB079

Figura 8: Estruturas químicas de 26SMB070 e 16SAB079.

Os dados obtidos no segundo trabalho corroboram resultados publicados do nosso grupo sobre a relevância quanto à ação tripanocida da presença do nitrogênio amidínico ligado diretamente a um grupamento aromático no espaçador, favorecendo um sistema de conjugação eletrônica e demonstrando a importância da estrutura molecular do espaçador. Todavia outras implicações envolvidas no mecanismo de ação e na atividade biológica destes compostos precisam ser mais exploradas e melhor compreendidas. De fato este é o primeiro estudo em *T. cruzi* na qual a amidina da AIA está ligada a carbonos alifáticos, de modo que é importante o conhecimento sobre as características moleculares para aprimorarmos a eficácia tanto sobre tripomastigotas quanto amastigotas.

Resumindo, os nossos dados reforçam a superior eficácia das AIAs sobre a DAs e mesmo sobre Bz (em ensaios *in vitro*) e fornecem informação relevante sobre relação estrutura-atividade para o desenho futuro de novos compostos amidínicos mais eficazes e que mantenham baixa toxicidade para células de mamífero. Como qualquer novo fármaco, estudos farmacológicos e toxicológicos mais detalhados devem ser explorados, visando a identificação de novos candidatos com potencial para o tratamento da doença de Chagas.

5. CONCLUSÕES

1. A atividade *in vitro* das amidinas, em especial das AIAs 18SAB075 e 16DAP002, avaliadas sobre tripomastigotas e amastigotas, revelou aspecto promissor, com baixo potencial de toxicidade sobre células de mamíferos.
2. Importantes diferenças na atividade tripanocida sobre formas não proliferativas flageladas e as proliferativas intracelulares foram observadas entre os compostos analisados, podendo estar correlacionadas a distintos mecanismos de captação e/ou extrusão dos compostos, e que precisam ser melhor compreendidos.
3. Pequenas modificações estruturais nas moléculas amidínicas resultaram em diferenças significativas na atividade antiparasitária. Por exemplo, a *meta*-N-metilação em ambos anéis terminais da DB2247 acarretou maior ação tripanocida em relação aos seus análogos monossubstituídos DB2246 e DB2238.
4. As arilimidamidas 18SAB075 e 16DAP002 apresentaram excelente atividade sobre as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* relevantes para infecção de mamíferos e sobre diferentes cepas de *T. cruzi*, alcançando valores *in vitro* de EC₅₀ na faixa submicromolar.
5. Apesar da atividade *in vitro* da 18SAB075 ter sido comparável ao Bz, esta AIA não foi ativa *in vivo*, apresentando ainda efeitos de toxicidade aguda em doses acima de 50 mg/kg.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(6):762-70.
- Andrade AL, Zicker F, Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, Andrade SS, Andrade JG, Martelli CM. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet 1996;348:1407-13.
- Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, Reis JN, Santos VC, Valadares HM, Reis MG, Macedo AM Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). Mem Inst Oswaldo Cruz 2011;106(8):948-56.
- Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AAV, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira MCV, Xavier SS, Oliveira Junior WA, Dias JCP. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Arq Bras Cardiol 2011;97(2, Suppl. 3):1-48.
- Arafa RK, Brun R, Wenzler T, Tanious FA, Wilson WD, Stephens CE, Boykin DW. Synthesis, DNA affinity, and antiprotozoal activity of fused ring dicationic compounds and their prodrugs. J Med Chem 2005 25;48(17):5480-8.
- Assal A, Corbi C. Chagas disease and blood transfusion: an emerging issue in non-endemic countries Transfus Clin Biol 2011;18(2):286-91.
- Atclas J, Sinagra A, Dictar M, Luna C, Verón MT, De Rissio AM, García MM, Salgueira C, Riarte A. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. Bone Marrow Transplant 2005;36(2):123-9.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Nat Acad Sci USA 2004;101:2034-39.
- Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento ÁF, Diniz Lde F, Caldas IS, Talvani A, Trunz BB, Torreele E, Ribeiro I. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis 2012;6(11):e1870.

- Bailly C, Arafa RK, Tanious FA, Laine W, Tardy C, Lansiaux A, Colson P, Boykin DW, Wilson WD. Molecular determinants for DNA minor groove recognition: design of a bis-guanidinium derivative of ethidium that is highly selective for AT-rich DNA sequences. *Biochemistry* 2005;44(6):1941-52.
- Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(12):3731-8.
- Bassotti G, Villanacci V. The pathophysiology of chagasic megacolon: beyond ICC. *Virchows Arch* 2013;462(1):125.
- Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde N. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2010a;54(7):2940-52.
- Batista DG, Pacheco MG, Kumar A, Branowska D, Ismail MA, Hu L, Boykin DW, Soeiro MN. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2010b;137(2):251-9.
- Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, Britto CC, Rodrigues AC, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde N. Combined treatment of heterocyclic analogues and benzimidazole upon *Trypanosoma cruzi* *in vivo*. *PLoS One* 2011;6(7):e22155.
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(4):655-81.
- Bonney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 2014;21:11.
- Brack C. Electronmicroscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop* 1968;25: 289-356.
- Brener Z, Alvarenga NJ. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector. Symposium on new approaches in American Trypanosomiasis Research. Ed Pan Amer Health Orgn 1976; p. 83-6.
- Buckner FS. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv Exp Med Biol* 2008;625:61-80.

- Buekens P, Almendares O, Carlier Y, Dumonteil E, Eberhard M, Gamboa-Leon R, James M, Padilla N, Wesson D, Xiong X. Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more? *Matern Child Health J* 2008;12:283-6.
- Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 2008;14(5):542-50.
- Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis* 2014;209(1):150-62.
- Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Suppl 3):331-5.
- Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:29-37.
- Cançado JR. Terapêutica específica *Em*: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Dias, Coura (eds), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1997; p. 323-51.
- Carod-Artal FJ. American trypanosomiasis. *Handb Clin Neurol* 2013;114:103-23.
- Cevallos AM, Hernández R. Chagas' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission. *Biomed Res Int* 2014;2014:401864
- Chai Y, Munde M, Kumar A, Mickelson L, Lin S, Campbell NH, Banerjee M, Akay S, Liu Z, Farahat AA, Nhili R, Depauw S, David-Cordonnier MH, Neidle S, Wilson WD, Boykin DW. Structure-dependent binding of arylimidamides to the DNA minor groove. *ChemBiochem* 2014;15(1):68-79.
- Chatelain E, Ioset JR. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Drug Des Devel Ther* 2011;5:175-81.
- Chirac P, Torreele E. Global framework on essential health R&D. *Lancet* 2006 13;367(9522):1560-1
- Cohen V, Ceballos V, Rodríguez N, González C, Marciano B, Dackiewicz N, Berberian G. Chagas' disease as a cause of cerebral mass in a patient with lymphoblastic leukemia in remission. *Arch Argent Pediatr* 2010;108(6):134-7.

- Cortes HC, Muller N, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A. *In vitro* effects of arylimidamides against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology* 2011;138(5):583-92.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 2010;115(1-2):5-13.
- Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3-24.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl 1):31-40.
- Coura JR, Junqueira A. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2012;107(2):145-54.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465(7301):S6-7.
- Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(8):962-7.
- Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(4):549-54.
- Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39 Suppl 3:113-7.
- Da Silva CF, Batista MM, Mota RA, de Souza EM, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MN. Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 2007;73(12):1939-46.
- Da Silva CF, Batista MM, Batista DG, De Souza EM, Da Silva PB, Oliveira GM, Meuser AS, Shareef AR, Boykin DW, Soeiro MN. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(9):3307-14.
- Da Silva CF, Daliry A, Da Silva PB, Akay S, Banerjee M, Farahat AA, Fisher MK, Hu L, Kumar A, Liu Z, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MN. The efficacy of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Parasitology* 2011a;138(14):1863-1869.

- Da Silva CF, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MN. *In vitro* trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother* 2011b;66(6):1295-7.
- Da Silva CF, Batista DG, Oliveira GM, De Souza EM, Hammer ER, da Silva PB, Daliry A, Araujo JS, Britto C, Rodrigues AC, Liu Z, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro Mde N. *In vitro* and *in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form-DB1965-against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One* 2012;7(1):e30356.
- Daliry A, Da Silva PB, Da Silva CF, Batista MM, De Castro SL, Tidwell RR, Soeiro MN. *In vitro* analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(4):747-50.
- Daliry A, Pires MQ, Da Silva CF, Pacheco RS, Munde M, Stephens CE, Kumar A, Ismail MA, Liu Z, Farahat AA, Akay S, Som P, Hu Q, Boykin DW, Wilson WD, De Castro SL, Soeiro MN. The trypanocidal activity of amidine compounds does not correlate with their binding affinity to *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(10):4765-73.
- De Araújo JS, Da Silva CF, Batista DG, Da Silva PB, Meuser MB, Aiub CA, da Silva MF, Araújo-Lima CF, Banerjee M, Farahat AA, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MN. The biological activity of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(7):4191-5.
- De Castro SL, Batista DG, Batista MM, Batista W, Daliry A, de Souza EM, Menna-Barreto RF, Oliveira GM, Salomão K, Silva CF, Silva PB, Soeiro MN. Experimental chemotherapy for Chagas disease: A Morphological, biochemical, and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and naphthoquinones. *Mol Biol Int* 2011;2011:306928.
- De Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, Wilson W D, Hu Q, Boykin DW, Batista MM, Araújo-Jorge TC, Soeiro MNC. Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem Pharmacol* 2004;8:593-600.

- De Souza EM, Menna-Barreto R, Araujo-Jorge TC, Kumar A, Hu Q, Boykin DW, Soeiro MN. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2006;133:75-9.
- De Souza EM, Oliveira GM, Soeiro MN. Electrocardiographic findings in acutely and chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice treated by a phenyl-substituted analogue of furamidine DB569. *Drug Target Insights* 2007;2:61-9
- De Souza EM, Da Silva PB, Nefertiti AS, Ismail MA, Arafa RK, Tao B, Nixon-Smith CK, Boykin DW, Soeiro MNC. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2011;127(2):429-35
- De Souza EM, Rivera MT, Araújo-Jorge TC, De Castro SL. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol Res* 2001;87(7):513-20.
- De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 2002a;8:269-85.
- De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 1984;86:197-283.
- De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 2002b;88:1013-25.
- De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. 1):89-100.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:513-5.
- Debache K, Guionaud C, Kropf C, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A. Experimental treatment of *Neospora caninum*-infected mice with the arylimidamide DB750 and the thiazolide nitazoxanide. *Exp Parasitol* 2011;129(2):95-100.
- Del Poeta M, Schell WA, Dykstra CC, Jones S, Tidwell RR, Czarny A, Bajic M, Kumar A, Boykin D, Perfect JR Structure-*in vitro* activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(10):2495-502.

- Dias JC, Amato Neto V, Luna EJ. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(3):375-9.
- Dias JC, Coura JR, Yasuda MA. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop 2014;47(1):123-5
- Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop 2008;41:193-6.
- Dias JC. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104 Suppl 1:41-5.
- Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ (1988) Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia 1988;44:880-1.
- DNDi. <http://www.dndi.org/treatments/paediatricbenz.html> acessado em 10/05/2014.
- Docampo R, Jimenez V, Lander N, Li ZH, Niyogi S. New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. Int Rev Cell Mol Biol 2013;305:69-113
- Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interact 1990;73:1-27.
- Docampo R, Moreno SNJ. Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed Proceedings 1986;45:2471-6.
- Docampo R, Moreno SNJ. Acidocalcisomes. Cell Calcium 2011;50(2):113-9.
- Docampo R, Jimenez J, King-Keller S, Li Z, Moreno SNJ. The Role of acidocalcisomes in the stress response of *Trypanosoma cruzi*. Adv Parasitol 2011;75:307-24.
- Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology 2014;141(1):140-6.
- Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, Romanha A. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104(1):27-32.

- Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc* 201;83(3):1041-4
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:755-9.
- Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, Cruz I, Gárate T, Cañavate C. *Clin Infect Dis* 2008;46(5):e44-7.
- Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1521-8.
- Gascon J, Vilasanjuan R, Lucas A. The need for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;12(4):393-5.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 1999;108(4):401-7.
- Guiang KM, Cantey P, Montgomery SP, Ailawadhi S, Qvarnstrom Y, Price T, Blodgett E. Reactivation of Chagas disease in a bone marrow transplant patient: case report and review of screening and management. *Transpl Infect Dis* 2013;15(6):E264-7
- Gus I, Molon ME, Bueno AP. Chagas disease: Review of 8 simultaneous cases of acute Chagas myocarditis: 25 years later. *Arq Bras Cardiol* 1993;60:99-101.
- Haanstra JR, van Tuijl A, Kessler P, Reijnders W, Michels PA, Westerhoff HV, Parsons M, Bakker BM. Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(46):17718-23.
- Hemmige V, Tanowitz H, Sethi A. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. *Int J Dermatol* 2012;51(5):501-8.
- Henriques-Pons A, Gomes MPVF. Chapter 2: Targeting T Cells to treat *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis; Em: Diagnosis and Treatment of Myocarditis, INtech, 2013;47-64. <http://dx.doi.org/10.5772/55301>,

- Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev 2001;14(4):659-88
- Higuchi ML, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Cardiovasc Res 2003;60:96-107.
- Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM, Pecoul B. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. PLoS Negl Trop Dis 2013;7(10):e2300.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. Int J Obst Gynecol 2014;121(1):22-33.
- Hucke O, Gelb MH, Verlinde CL, Buckner FS. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. J Med Chem 2005;48(17):5415-8.
- Ismail MA, Brun R, Wenzler T, Tanious FA, Wilson WD, Boykin DW. Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents. Bioorg Med Chem 2004;12(20):5405-13
- Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, Sztajzel J, Besse V, Loutan L, Gaspoz JM, Jannin J, Albajar Vinas P, Luquetti A, Chappuis F. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas Disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. PLoS Negl Trop Dis 2010;4(2): e592.
- Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102 (Suppl 1):95-7.
- Kappagoda S, Ioannidis JP. Neglected tropical diseases: survey and geometry of randomised evidence. BMJ 2012;345:e6512.
- Kappagoda S, Ioannidis JP. Prevention and control of neglected tropical diseases: overview of randomized trials, systematic reviews and meta-analyses. Bull World Health Organ 2014;92(5):356-366C.
- Keenan M, Alexander PW, Diao H, Best WM, Khong A, Kerfoot M, Thompson RC, White KL, Shackelford DM, Ryan E, Gregg AD, Charman SA, von Geldern TW,

Scandale I, Chatelain E. Design, structure-activity relationship and *in vivo* efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* 2013;21(7):1756-63.

Köberle F. Patogênese dos “megas”. *Rev Goiana Med* 1956;2:101-10.

Kocher C, Segerer S, Schleich A, Caduff R, Wyler LG, Müller V, Beck B, Blum J, Kamarachev J, Mueller NJ. Skin lesions, malaise, and heart failure in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2012;14(4):391-7.

Kohl S, Pickening LK, Frankel LS, Yager RG. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 1982;50: 827-828.

Kraus JM, Verlinde CL, Karimi M, Lepesheva GI, Gelb MH, Buckner FS. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. *J Med Chem* 2009;52(6):1639-47.

Lafepe. Guia de Compras. 2º edição junho 2012.

Lanteri CA, Stewart ML, Brock JM, Alibu VP, Meshnick SR, Tidwell RR, Barrett MP. Roles for the *Trypanosoma brucei* P2 transporter in DB75 uptake and resistance. *Mol Pharmacol* 2006;70(5):1585-92.

Lattes R, Lasala MB. Chagas disease in the immunosuppressed patient. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):300-9

Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 2013;13(4):342-8

Lent H, Wygodzinky P. Revision of the Triatominae Hemiptera, Reduviidae and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Natl Hist* 1979;163:123-520.

Lepesheva GI, Hargrove TY, Anderson S, Kleshchenko Y, Furtak V, Wawrzak Z, Villalta F, Waterman MR. Structural insights into inhibition of sterol 14alpha-demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2010;285(33):25582-90.

Lepesheva GI. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? *Expert Opin Drug Discov* 2013;8(12):1479-89

- Macêdo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas *Em: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*, Dias, Coura (eds), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1997, p. 383-409.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* 2012b;34(6):753-70.
- Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev* 2012a;20(2):53-6.
- Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, Machado-Coelho GL, Albajar-Viñas P, Torres RM, Lana Md. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108(7):873-80
- Manne J, Snively CS, Levy MZ, Reich MR. Supply chain problems for Chagas disease treatment. *Lancet Infect Dis* 2012;12(3):173-5.
- Manne JM, Snively CS, Ramsey JM, Salgado MO, Bärnighausen T, Reich MR. Barriers to treatment access for Chagas disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(10):e2488.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, C Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Supl. 1): 319-24.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2008;156(1):37-43.
- Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JC, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Vitelli-Avelar DM, Bahia MT, Martins-Filho OA, Macedo AM, Lana M. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative

- blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1319-27.
- Mäser P, Wittlin S, Rottmann M, Wenzler T, Kaiser M, Brun R. Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. *Current Opinion in Pharmacology* 2012;12:562–566
- Mathis AM, Bridges AS, Ismail MA, Kumar A, Francesconi I, Anbazhagan M, Hu Q, Tanious FA, Wenzler T, Saulter J, Wilson WD, Brun R, Boykin DW, Tidwell RR, Hall JE. Diphenyl furans and aza analogs: effects of structural modification on in vitro activity, DNA binding, and accumulation and distribution in trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(8):2801-10.
- Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR, Hall JE. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(6):2185-91.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146:601-20.
- McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl 1):263-9.
- Meirelles MNL, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural cytochemistry of mitochondrial enzymes. *Exp Parasitol* 1980;81:373-81.
- Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;37:252-60.
- Michels PAM, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1463-77.
- Ministerio da Saúde (2014). <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> acesso maio 2014.
- Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*

in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(1):150-5.

Molyneux DH, Malecela MN. Neglected tropical diseases and the millennium development goals: why the "other diseases" matter: reality versus rhetoric. *Parasit Vectors* 2011;4:234.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100(8):663-77.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. 1):17-30.

Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM: Control of transfusional transmission. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44(Suppl. 2):64-7.

Moreno SNJ, DoCampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AOM. Different behaviour of benznidazol as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys* 1982;218:585-91.

Médicos Sem Fronteiras. 2011 The shortage of benznidazole leaves thousands of chagas patients without treatment, <http://doctorswithoutborders.com/press/release.cfm?id=5547&cat=press-release>. Acesso 12/05/2014.

Médicos Sem Fronteiras. 2013 <http://www.msf.org.ar/>

Murta SM, Romanha AJ. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 1998;116:165-71.

Nehrbass-Stuedli A, Boykin D, Tidwell RR, Brun R. Novel diamidines with activity against *Babesia divergens* in vitro and *Babesia microti* in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(7):3439-45.

Norman FF, López-Vélez R. Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis* 2013;19(10):1561-6.

Noya BA, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010;201:1308-15.

- Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:941-55
- OMS 2013 Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 153 pp.
- Organização Panamericana de Saúde (2014). <http://www.paho.org> acesso maio 2104
- Ortí-Lucas RM, Parada-Barba MC, de la Rubia-Ortí JE, Carrillo-Ruiz A, Beso-Delgado M, Boone AL. Impact of chagas disease in bolivian immigrants living in europe and the risk of stigmatization. *J Parasitol Res.* 2014;2014:514794
- Pacheco MG, Da Silva CF, De Souza EM, Batista MM, Silva PB, Kumar A, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MN. *Trypanosoma cruzi*: activity of heterocyclic cationic molecules *in vitro*. *Exp Parasitol* 2009;123(1):73-80.
- Paine MF, Wang MZ, Generaux CN, Boykin DW, Wilson WD, De Koning HP, Olson CA, Pohlig G, Burri C, Brun R, Murilla GA, Thuita JK, Barrett MP, Tidwell RR. Diamidines for human African trypanosomiasis. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(8):876-83.
- Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin* 2011;29(1):53-62
- Paulin JJ. The chondriome of selected trypanosomatids. A three dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. *J Cell Biol* 1975; 66: 404-413.
- Penha LL, Sant'Anna CB, Mendonça-Previato L, Cunha-e-Silva NL, Previato JO, Lima AP. Sorting of phosphoglucomutase to glycosomes in *Trypanosoma cruzi* is mediated by an internal domain. *Glycobiology* 2009;19(12):1462-72.
- Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Parola P, Jackson Y, Odolini S, Lopez-Velez R; EuroTravNet Network. EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. *Euro Surveill* 2011;16(37): 19966.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Cortes-Lletget C, Posada Ede J, Aldasoro E, Oliveira I, Muñoz J, Gállego M, Gascon J. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(1):e1965.

- Pizzi T, Croizet VA, Smok G, Dias M. Enfermedad de Chagas en un paciente con transplante renal y tratamiento inmunosupresor. *Rev Med Chile* 1982;110:1207-11.
- Polak A, Richle R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol* 1978;72: 228-32.
- Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Amato VS, Rassi Jr A, Luquetti AO, Rassi SG. A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;37:485-9.
- Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Ferriolli Filho F, Amato VS. Specific treatment attempt, with ticlopidine, of patients with Chagas disease chronic phase. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:225-6.
- Rassi Jr A, Rassi A, Little WC. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med* 2006;355:799-808.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 2012;26(2):275-91.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375(9723):1388-402.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. I):152-8.
- Rezende JM. The digestive tract in Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:97-106.
- Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31:301-4.
- Richard JV, Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14(4):447-55.
- Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5:727-43.
- Romanha AJ, De Castro SL, Soeiro MNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, Bourdin B, Blum B, Olivieri B, Zani C, Spadafora C, Chiari E, Chatelain E,

- Chaves G, Calzada JE, Bustamante JM, Freitas-Junior LH, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Andrade SG, Armstrong T, Degraeve W, Andrade Zde A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(2):233-8.
- Rosypal AC, Werbovets KA, Salem M, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW, Hall JE, Tidwell RR. Inhibition by dications of *in vitro* growth of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: causative agents of old world cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 2008;94(3):743-9.
- Sajid M, Robertson SA, Brinen LS, McKerrow JH. Cruzain: the path from target validation to the clinic. *Adv Exp Med Biol* 2011;712:100-15.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010;115(1-2):14-21.
- Schofield CJ, Jannin J, R. Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 2006;22(12):583-8.
- Schorer M, Debache K, Barna F, Monney T, Müller J, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. Di-cationic arylimidamides act against *Neospora caninum* tachyzoites by interference in membrane structure and nucleolar integrity and are active against challenge infection in mice. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012;2:109-20.
- Schormann N, Velu SE, Murugesan S, Senkovich O, Walker K, Chenna BC, Shinkre B, Desai A, Chattopadhyay D. Synthesis and characterization of potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorg Med Chem* 2010;18(11):4056-66.
- Sealey-Cardona M, Cammerer S, Jones S, Ruiz- Perez LM, Brun R, Gilbert IH, Urbina JA, González-Pacanowska D. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2123-9.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:117-43.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, Amato Neto V, Tolezano JE, Peres BA, Arruda Jr ER. Possible oral transmission

of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991;33:351-57.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 2012;54(6):845-52.

Silveira AC. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. *Cad Saúde Pública* 2000;16(2):35-42.

Soeiro MNC, De Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:105-21.

Soeiro MNC, De Souza EM, Stephens CE, Boykin DW. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. *Exp Opin Investig Drugs* 2005;14:957-72.

Soeiro MNC, Dailyri A, Da Silva CF, Batista DGJ, Souza EM, Oliveira GM, Salomão K, Batista MM, Pacheco M, Silva PB, Santa-Rita RM, Menna-Barreto RFS, Boykin, DW, De Castro SL. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions through *in vivo* and *in vitro* studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. 1): 301-310.

Soeiro MNC, Werbovets K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology* 2013a;140(8):929-51.

Soeiro MNC, De Souza EM, Da Silva CF, Batista DG, Batista MM, Pavão BP, Araújo JS, Aiub CA, da Silva PB, Lionel J, Britto C, Kim K, Sulikowski G, Hargrove TY, Waterman MR, Lepesheva GI. *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013b;57(9):4151-63.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:526-9.

Souza-Lima RC, Barbosa M, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento AS, Ferreira JM, Magalhães LK, Albuquerque BC, Araújo GA, Guerra JA. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46(4):510-4.

- Stadelmann B, Küster T, Scholl S, Barna F, Kropf C, Keiser J, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. *In vitro* efficacy of dicationic compounds and mefloquine enantiomers against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(10):4866-72.
- Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:25-32.
- Stephens CE, Brun R, Salem MM, Werbovetz KA, Tanious F, Wilson WD, Boykin DW. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(12):2065-9.
- Stephens CE¹, Tanious F, Kim S, Wilson WD, Schell WA, Perfect JR, Franzblau SG, Boykin DW. Diguanidino and "reversed" diamidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. *J Med Chem* 2001;44(11):1741-8.
- Szajnman SH, Ravaschino EL, Docampo R, Rodriguez JB. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(21):4685-90.
- Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol* 2003;19(10):447-51.
- Tidwell RR, Boykin DW. Dicationic DNA minor groove binders as antimicrobial agents. In: Demeunynck M, Bailly C, Wilson WD, editors. *DNA and RNA binders*. Wiley-VCH; 2003. p. 414-60.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(7):1771-7.
- Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 2002;8:287-95.
- Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl. 11): 311-318.

- Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascon J; Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(2):635-9
- Viotti R, Vigliano C, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, Armenti A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:157-63.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:724-34.
- Wang MZ, Zhu X, Srivastava A, Liu Q, Sweat JM, Pandharkar T, Stephens CE, Riccio E, Parman T, Munde M, Mandal S, Madhubala R, Tidwell RR, Wilson WD, Boykin DW, Hall JE, Kyle DE, Werbovetz KA. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(6):2507-16.
- Ward CP, Wong PE, Burchmore RJ, de Koning HP, Barrett MP. Trypanocidal furamide analogues: influence of pyridine nitrogens on trypanocidal activity, transport kinetics, and resistance patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(5):2352-61
- Wenck MA, Medrano FJ, Eakin AE, Craig SP. Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* 2004;1700(1):11-8.
- Werbovetz K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7:147-57.
- Wilson WD, Tanious FA, Mathis A, Tevis D, Hall JE, Boykin DW. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie* 2008;90(7):999-1014.
- Zhu X, Liu Q, Yang S, Parman T, Green CE, Mirsalis JC, Soeiro MNC, Mello de Souza E, da Silva CF, Batista DJG, Stephens CE, Banerjee M, Farahat AA, Munde M, Wilson WD, Boykin DW, Wang MZ, Werbovetz KA. Evaluation of arylimidamides DB1955 and DB1960 as candidates against visceral leishmaniasis and Chagas' disease: *in vivo* efficacy, acute toxicity,

pharmacokinetics, and toxicology studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(7):3690-9.

Zuma AA, Cavalcanti DP, Maia MC, D e Souza W, Motta MC. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(5):449-56.