

Daiane Dias Ferreira

Reposicionamento de fármacos e estudo de novas  
combinações terapêuticas no tratamento etiológico da  
doença de Chagas

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Coordenadoria de  
Controle de Doenças da Secretaria  
de Estado da Saúde de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre  
em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientador:** Prof. Dr. André  
Gustavo Tempone Cardoso.

**Co-orientadora:** Dra. Thaís Alves  
da Costa Silva.

SÃO PAULO  
2014

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ferreira, Daiane Dias

Reposicionamento de fármacos e estudo de novas combinações terapêuticas no tratamento etiológico da doença de Chagas/ Daiane Dias Ferreira - São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

Co-orientadora: Thais Alves da Costa Silva

1. Reposicionamento de fármacos
2. Doença de Chagas
3. Tratamento
4. Fármacos

SES/CCD/CD-291/14

Dedico este trabalho aos meus queridos familiares e aos pacientes com  
doença de Chagas espalhados ao redor do mundo.

*“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de  
existir”*

*(Steve Jobs)*

## **AGRADECIMENTOS**

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Sendo assim, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

A minha querida mãe Zaira pelo imenso apoio, amor, paciência, carinho, compreensão e estímulo para realizar este trabalho. Obrigada.

Ao meu irmão Marcos, minha tia Leonina e minha prima Eliane pelo incentivo e apoio na realização deste projeto.

Aos meus entes queridos que já não estão mais presentes, mas tenho certeza estariam orgulhosos e felizes com esta minha conquista, meu pai José Roberto e em especial minha avó Amélia que sempre me incentivou e me fez acreditar que “Eu sou capaz”.

Ao meu orientador professor doutor André Gustavo Tempone pela oportunidade e confiança depositadas, pelo conhecimento e incentivo, além da paciência dia após dia.

À minha co-orientadora e amiga querida doutora Thais Alves da Costa Silva por compartilhar seus conhecimentos, pela ajuda, paciência, atenção e amizade depositadas ao longo desse trabalho.

Ao meu namorado Paulo Henrique e toda a sua família pelo incentivo e por acreditarem no meu potencial para realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida (CAPES).

Ao professor doutor Humberto Ferraz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela disponibilização dos fármacos utilizados nesse trabalho.

Aos técnicos de laboratório Matília Nascimento e Vicente Duarte pela assistência e ajuda laboratorial prestada, além do companheirismo e amizade ao longo desta jornada.

Aos funcionários da Seção de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz pela convivência.

Às minhas queridas amigas do laboratório de Toxinologia Aplicada, Daniela, Isabela, Juliana, Lígia, Marta, Sônia e Tatiana pela ajuda diária nos experimentos e principalmente pelas conversas nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre me ouvirem.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular Cida, Cristina, Gabriela, Inara, Kate e Lilian, os amigos Alexandre, Dan, Jeferson, Luís e Ricardos pelos almoços, cafés e principalmente pelos momentos de descontração.

Em especial, agradeço a amiga Érika pela ajuda, paciência, companheirismo e amizade ao longo desta jornada.

Enfim, sou grata a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

## RESUMO

Dentre as doenças parasitárias tropicais, as causadas por protozoários se apresentam como um grande desafio para a saúde pública. Conhecida também como tripanossomíase americana, a doença de Chagas é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina, com cerca de 8-10 milhões de pessoas infectadas. A quimioterapia utiliza medicamentos de elevada toxicidade, e no Brasil, restringe-se a um único fármaco, o benznidazol. Na busca por terapias alternativas, o reposicionamento de fármacos representa uma forma promissora para introdução de novos medicamentos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico contra *T. cruzi* de fármacos aprovados clinicamente, utilizando modelos *in vitro* e experimentais. Dentre os 54 fármacos testados, 17 apresentaram atividade contra formas tripomastigotas, com  $CE_{50}$  variando entre 1,8 a 81  $\mu\text{M}$ , destacando-se a sertralina como o mais efetivo e o cloxazolam como o menos efetivo. Dentre 6 fármacos escolhidos, 5 demonstraram atividade contra os amastigotas intracelulares, com  $CE_{50}$  entre 1,4 a 32  $\mu\text{M}$ , destacando-se a sertralina como o mais efetivo e o saquinavir como o menos efetivo. Realizou-se ainda um estudo de citotoxicidade, e o índice de seletividade dos fármacos variou entre 1,2 a 17. Por meio da construção de isobogramas, realizou-se um estudo *in vitro* de associação terapêutica contra formas tripomastigotas entre a nitazoxanida e a sertralina, resultando em uma combinação indiferente. A efetividade *in vivo* da sertralina e da nitazoxanida foi verificada em modelo de camundongos Swiss; apenas a nitazoxanida reduziu em 29% a parasitemia após 5 dias consecutivos de tratamento a 50 mg/kg. Finalmente, um estudo comparativo foi desenvolvido entre a técnica de qPCR e o método de Brener por contagem em microscopia óptica. Foi observada similaridade entre ambas as técnicas para avaliação da parasitemia no modelo murino. O reposicionamento de fármacos aprovados e suas associações terapêuticas poderiam contribuir com tratamentos mais efetivos e menos tóxicos para doenças negligenciadas, como a doença de Chagas.

## ABSTRACT

Among tropical parasitic diseases, those caused by protozoans represent as a major challenge to public health. Also known as American trypanosomiasis, Chagas's disease is found mainly in endemic areas of 21 countries of Latin America, with approximately 8-10 million people infected. The chemotherapy is based in highly toxic drugs with high toxicity and, in Brazil, it is restricted to a single drug, the benznidazole. In the search for alternative therapies, the repositioning of drugs represents a promising approach for the introduction of new medicines. This study aimed the evaluation of the therapeutic potential against *T. cruzi* of clinically approved drugs using *in vitro* and experimental models. Among the 54 tested drugs, 17 showed activity against trypomastigotes, with EC<sub>50</sub> ranging from 1.8 to 81 µM; sertraline was the most effective drug and cloxazolam the least effective. Among 6 chosen drugs, 5 demonstrated activity against intracellular amastigotes with EC<sub>50</sub> between 1.4 to 32 µM; sertraline as the most effective and saquinavir the least one. The mammalian cytotoxicity was also evaluated and selectivity index of drugs ranged from 1.2 to 17 µM. Through the construction of isobolograms, an *in vitro* study of combined therapy against trypomastigotes was performed with nitazoxanide and sertraline, resulting in an indifferent combination. The *in vivo* efficacy of nitazoxanide and sertraline was observed in Swiss mice model; nitazoxanide reduced by 29% the parasitemia after 5 consecutive days of treatment at 50 mg/kg. Finally, a comparative study was conducted between the qPCR technique and the method of Brener by light microscopy counting. A similar result was found for both techniques when evaluating the animals parasitemia in the murine model. The repositioning of approved drugs and their therapeutic associations could contribute to more effective and less toxic treatments for neglected diseases as Chagas disease.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C.....	.....	graus Celsius
CO <sub>2</sub> .....	.....	Gás carbônico
CE <sub>50</sub> .....	.....	Concentração efetiva 50%
CC <sub>50</sub> .....	.....	Concentração citotóxica 50%
MeOH.....	.....	Metanol
OMS.....	.....	Organização mundial da saúde
CDC.....	.....	Centers for Disease Control and Prevention
CIF.....	.....	Concentração Inibitória Fracionária
DMSO .....	.....	Dimetilsulfóxido
FIOCRUZ .....	.....	Fundação Oswaldo Cruz
IS.....	.....	Índice de seletividade
XΣCIF.....	.....	Média da Somatória da Concentração Inibitória Fracionária
M-199 .....	.....	Meio 199
MS .....	.....	Ministério da Saúde
NTZ .....	.....	Nitazoxanida
PBS .....	.....	Phosphate-buffered saline
RPMI 1640 .....	.....	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
ΣCIF.....	.....	Somatória da Concentração Inibitória Fracionária
SFB .....	.....	Soro fetal bovino
D.P.I.....	.....	dias pós infecção
D.P.T.....	.....	dias pós tratamento
DNDi.....	.....	Drugs for Neglected Diseases Initiative
RPM.....	.....	Rotações por minuto
I.P.....	.....	Intraperitoneal
µL.....	.....	Microlitro
µM.....	.....	Micromolar
PCR.....	.....	Reação em Cadeia da Polimerase
Ct.....	.....	Threshold cycle
SLC.....	.....	Sistemas de Liberação Controlada
DL <sub>50</sub> .....	.....	Dose Letal 50%

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Morfologia externa do <i>Triatoma infestans</i> . Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013. ....	17
<b>Figura 2:</b> <i>T. cruzi</i> penetrando em célula hospedeira. Microscopia eletrônica de varredura. Original de Sérgio Schenkman.....	19
<b>Figura 3:</b> Observação microscópica do protozoário <i>T. cruzi</i> em sua forma tripomastigota sanguíneo. Original. Daiane Dias Ferreira .....	20
<b>Figura 4:</b> Observação microscópica do protozoário <i>T. cruzi</i> em sua forma epimastigota. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.....	21
<b>Figura 5:</b> Observação microscópica de macrófagos infectados por <i>T. cruzi</i> em sua forma amastigota. Original de Daiane Dias Ferreira. ....	21
<b>Figura 6:</b> Ciclo de transmissão do <i>T. cruzi</i> . Fonte: Center for Disease Control and Prevention, 2013. ....	22
<b>Figura 7:</b> Criança apresentando sinal de Romana. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013. ....	24
<b>Figura 8:</b> Estrutura química do nifurtimox (PubChem, 2013).....	28
<b>Figura 9:</b> Estrutura química do benznidazol (PubChem, 2013). ....	28
<b>Figura 10:</b> Diferentes classes terapêuticas utilizadas na triagem, representadas em porcentagem. ....	36
<b>Figura 11:</b> Estrutura química da nitazoxanida (PubChem, 2013). ....	43
<b>Figura 12:</b> Estrutura química da sertralina (PubChem, 2013).....	44
<b>Figura 13:</b> Classes terapêuticas dos fármacos que apresentaram atividade anti- <i>T. cruzi</i> contra formas tripomastigotas. ....	53
<b>Figura 14:</b> Curvas de dose-resposta geradas pela associação de nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....	58
<b>Figura 15:</b> Isoblograma gerado com base nos valores de $CE_{50}$ da associação de nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . Os pontos $P_1$ , $P_2$ , $P_3$ , $P_4$ , $P_5$ e $P_6$ correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de nitazoxanida e sertralina, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade, as linhas pontilhadas indicam a faixa de confiança e as barras ao redor dos pontos correspondem aos intervalos de confiança. ....	60

<b>Figura 16:</b> Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação de nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas.....	61
<b>Figura 17:</b> Avaliação da parasitemia de camundongos Swiss infectados previamente com $1 \times 10^5$ tripomastigotas/animal de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) por microscopia óptica segundo Brener.....	62
<b>Figura 18:</b> Avaliação do tratamento <i>in vivo</i> de camundongos infectados com $1 \times 10^5$ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados com o fármaco sertralina na dose de 40 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos (i.p.). O fármaco benznidazol foi utilizado como controle do ensaio e administrado na dose de 50 mg/kg/dia (i.p.). A parasitemia dos grupos tratados e controle foi determinada pelo método de Brener. * ( $p < 0.05$ ).....	63
<b>Figura 19:</b> Avaliação da mortalidade referente ao tratamento <i>in vivo</i> de camundongos infectados com $1 \times 10^5$ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados com o fármaco sertralina na dose de 40 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos (i.p.). O fármaco benznidazol foi utilizado como controle do ensaio e administrado na dose de 50 mg/kg/dia (i.p.).....	64
<b>Figura 20:</b> Avaliação do tratamento <i>in vivo</i> de camundongos infectados com $1 \times 10^5$ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados com o fármaco nitazoxanida na dose de 50 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos (i.p.). A parasitemia dos grupos tratados e controle foi determinada pelo método de Brener. * ( $p < 0.05$ ) .....	65
<b>Figura 21:</b> Avaliação da mortalidade dos grupos de camundongos Swiss infectados pela via intraperitoneal com $1 \times 10^5$ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados com nitazoxanida. O grupo controle utilizou apenas o veículo como controle interno. ....	66
<b>Figura 22:</b> Curva padrão obtida do log das diluições seriadas de DNA de <i>T. cruzi</i> e seus respectivos valores de CT.....	66
<b>Figura 23:</b> Avaliação da parasitemia de camundongos infectados com $1 \times 10^5$ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo método de Brener (A) e pela qPCR (B).....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Reposicionamento de fármacos em uso clínico e em estudos pré-clínicos.....	32
<b>Tabela 2:</b> Fármacos estudados contra formas tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	37
<b>Tabela 3:</b> Valores expressos em $\mu\text{M}$ das $\text{CE}_{50}$ dos fármacos estudados contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade em células de mamífero NCTC e IS dos fármacos. ....	55
<b>Tabela 4:</b> Valores de $\text{CE}_{50}$ e CIFs da associação entre os fármacos nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	59
<b>Tabela 5:</b> Valores da $\chi^2$ CIF associação entre os fármacos nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	59

## INDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Doenças Negligenciadas</b> .....	15
<b>1.2 Doença de Chagas</b> .....	15
1.2.1 Histórico .....	15
1.2.2 Epidemiologia .....	16
1.2.3 Vetores .....	17
1.2.4 Agente Etiológico.....	19
1.2.5 Ciclo Biológico .....	22
1.2.6 Manifestações Clínicas .....	23
1.2.7 Diagnóstico.....	25
1.2.8 Tratamento .....	27
<b>1.3 Reposicionamento de Fármacos</b> .....	30
<b>1.4 Justificativa e Relevância</b> .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.1 Fármacos Estudados</b> .....	36
<b>3.2 Reagentes e compostos sintéticos</b> .....	45
<b>3.3 Parasitas, células de mamífero e animais de experimentação</b> .....	45
3.3.1 Manutenção do parasita .....	45
3.3.2 Células de mamífero NCTC.....	46
3.3.3 Animais de experimentação .....	46
<b>3.4 Triagem da biblioteca de fármacos</b> .....	46
3.4.1 Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ) .....	46
3.4.2 Ensaio de citotoxicidade .....	47

3.4.3 Ensaio com formas amastigotas .....	48
<b>3.5 Determinação <i>in vitro</i> das associações entre nitazoxanida e sertralina .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6 Estudo <i>in vivo</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Extração de DNA de tripomastigotas da cepa Y para confecção de curva padrão .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8 Avaliação da parasitemia pela PCR em tempo real .....</b>	<b>51</b>
<b>3.9 Análise estatística .....</b>	<b>52</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Triagem da biblioteca de fármacos .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Determinação da atividade anti-<i>T. cruzi</i> e citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos estudados.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Associação entre nitazoxanida e sertralina .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Estabelecimento da curva de parasitemia em modelo experimental .....</b>	<b>61</b>
<b>4.5 Estudo da efetividade da setralina e da nitazoxanida em modelo experimental .....</b>	<b>62</b>
<b>4.6 Avaliação da parasitemia pela PCR em tempo real (pPCR).....</b>	<b>66</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>101</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças Negligenciadas

Doenças tropicais negligenciadas, como leishmaniose, malária e doença de Chagas estão entre as dez principais causas de morte prematura em todo mundo (Hotez et al., 2007). Tais doenças desenvolvem-se em climas quentes e úmidos, principalmente nos trópicos e incluem um forte impacto na economia e problemas à Saúde Pública (Trouiller et al., 2002; Lal, 2013). O que faz com essas doenças sejam tratadas em conjunto, é o fato de estarem entre as infecções mais comuns atingindo cerca de 2,7 bilhões de pessoas, além disso, existe a falta de interesse do setor farmacêutico privado em desenvolver novas terapias, gerando um círculo vicioso, onde a pobreza leva a doença e por sua vez a doença aumenta a pobreza (Hotez et al., 2007; Lal, 2013).

## 1.2 Doença de Chagas

### 1.2.1 Histórico

A origem da doença de Chagas apresenta como hipótese a mudança de hábitos das populações pré-históricas dos Andes quando passaram a domesticar os animais e adotaram a agricultura cerca de seis mil anos atrás (Ferreira et al., 2011). No entanto, estudos relacionados à paleoparasitologia baseados na biologia molecular, demonstraram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas podem ser tão antigas quanto à presença humana no continente americano (Aufderheide et al., 2004; Lima et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Araújo et al., 2009).

Descoberta em 1909 por Carlos Chagas, médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz na cidade mineira de Lassance, a doença foi estudada por ele em seus vários aspectos, relativos a transmissão, ao parasita e às características clínicas (Kropf, 2005). A descoberta da doença

de Chagas trouxe a consagração internacional ao cientista mineiro, que recebeu o Prêmio Schaudinn do Instituto de Doenças Tropicais de Hamburgo, na Alemanha. Contudo em 1922, um grupo de médicos contestou a autoria da descoberta do protozoário e a importância atribuída à doença. Embora a Academia Nacional de Medicina tenha reconhecido que Chagas era realmente o autor da descoberta, somente após sua morte o impacto sanitário da doença começou a ser reconhecido, com a descrição de centenas de casos agudos na Argentina e a descoberta de um importante foco em Bambuí, no estado de Minas Gerais (FioCruz, 2014).

### **1.2.2 Epidemiologia**

Conhecida também como tripanossomíase americana, a doença de Chagas é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina com cerca de 8-10 milhões de pessoas infectadas e uma taxa de mortalidade anual de aproximadamente 14.000 indivíduos (Schmunis e Yadon, 2010; WHO, 2013).

No Brasil dados apontam cerca de 2-3 milhões de pessoas infectadas (Akhavan, 2000; Dias, 2007; Ramos Jr. et al., 2010) e aproximadamente 6.000 mortes são registradas por ano (Martins-Melo et al., 2012a, Martins-Melo et al., 2012b; Martins-Melo et al., 2012d).

Atualmente, a doença de Chagas tem recebido grande atenção como um problema emergente na América do Norte, Europa e alguns países ocidentais em função das migrações internacionais de áreas endêmicas para áreas não-endêmicas (Gascon et al., 2010; Schmunis e Yadon, 2010; WHO, 2013). Nos Estados Unidos em meados dos anos 50, foram relatados os primeiros casos da doença (Woody e Woody, 1955), posteriormente uma pesquisa realizada com imigrantes da América Central na região de Washington, mostrou uma prevalência de 4,9% da doença nesta população (Kirchhoff et al., 1987). Pouco tempo depois, foram identificados casos em Nova York e Manitoba no Canadá (Grant et al., 1989; Nickerson et al., 1989).

Em outras regiões do mundo a imigração tem contribuído para o surgimento da doença (Schmunis, 2007; Lescure et al., 2008; Gascon et al., 2010). Sendo assim, é importante ressaltar que a doença de Chagas, representa um grande desafio para os países não endêmicos, uma vez que, entre as populações imigrantes, a maioria dos membros não sabem que estão infectados, além disso, os serviços de saúde desses países não estão preparados para gerenciar essa doença (Schmunis, 2007).

Dessa forma, são necessários esforços para que os serviços especializados, infraestrutura adequada, além de pessoal treinado para receber essa população sejam desenvolvidos com seriedade e competência nestes países. Assim, é evidente que os desafios da doença de Chagas tornaram-se globais (Schmunis, 2007; Tanowitz et al., 2011).

### 1.2.3 Vetores

A doença de Chagas é transmitida por insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiros, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Essa família possui mais de cem espécies, entre as quais várias apresentam capacidade de transmissão da doença. No entanto, a principal espécie relacionada à doença de Chagas no Brasil é o *Triatoma infestans* (Fig. 1).



**Figura 1:** Morfologia externa do *Triatoma infestans*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Das 140 espécies de triatomíneos conhecidas atualmente, 69 foram identificadas no Brasil e são encontradas em vários estados florestais, de todos os biomas. A princípio, esses insetos eram encontrados em ambientes silvestres, apresentando como reservatórios tatus, gambás entre outros

roedores. Porém, com a devastação das matas, os insetos migraram para pequenos povoados com condições de habitação desfavoráveis. Uma vez na área urbana, os mamíferos domésticos como o cão e o gato começaram a albergar o parasita e passaram então a atuar como novos reservatórios (Ministério da Saúde, 2009).

Em meados de 1950, o governo brasileiro iniciou campanhas para controlar os vetores da doença de Chagas, em algumas regiões do país, no entanto, só na década de 80 essas campanhas foram estendidas para todo o território (Pereira e Navarro, 2013). Em 1991, os países da América do Sul, (Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Peru) iniciaram um programa de cooperação internacional, denominado Iniciativa do Cone Sul, cujo objetivo era controlar o vetor e a transmissão transfusional (Moraes-Souza, 1999; Silveira e Pimenta, 2011). As campanhas para erradicação do vetor apresentaram resultados tão impressionantes que alguns países receberam uma certificação de livres de transmissão vetorial, incluindo o Uruguai (1997), Chile (1999), e o Brasil em (2006), (Pereira e Navarro, 2013).

No entanto, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) ressalta que apesar de uma área estar livre do vetor *T. infestans*, isso não significa que houve a interrupção completa da transmissão, apesar do controle ser bastante eficaz (Fitarelli e Horn, 2009; Abad-Franch et al., 2013).

Com a interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans* no país, outras espécies de triatomíneos têm apresentado importância na manutenção da doença no homem, são elas: *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma tibiamaculata*, *Triatoma arthurneivai*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus diasi*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius megistus* e *Rhodnius domesticus* (Silveira e Vinhaes, 1999; Coura e Borges-Pereira, 2012).

Apesar de a doença estar bem controlada, deve-se atentar para o fato de que o assunto não está totalmente encerrado, pois, mesmo na ausência de triatomíneos da espécie *T. infestans*, persistem na natureza triatomíneos

secundários que podem ocupar o nicho dessa espécie. Estudo realizado por Silistino-Souza e colaboradores (2013), demonstraram que três fêmeas adultas e um macho adulto de *T. sórdida* foram positivas para o parasita *T. cruzi* na região noroeste do estado de São Paulo. No estado do Maranhão entre 1994 e 2008 quatro exemplares de *Rhodnius robustus* foram capturados sendo um deles positivo para as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (Cutrin et al., 2010).

Devemos estar preparados para enfrentar situações raras, assim como casos agudos esporádicos, a possível adaptação dos triatomíneos a novos ecótopos e o monitoramento da resistência dos triatomíneos aos inseticidas empregados em seu controle (Wanderley et al., 2010, da Silva et al., 2011).

#### 1.2.4 Agente Etiológico

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, sendo caracterizado pela existência de um cinetoplasto que se localiza próximo ao flagelo onde contém o DNA mitocondrial (Telleria et al., 2006) **(Fig. 2)**.



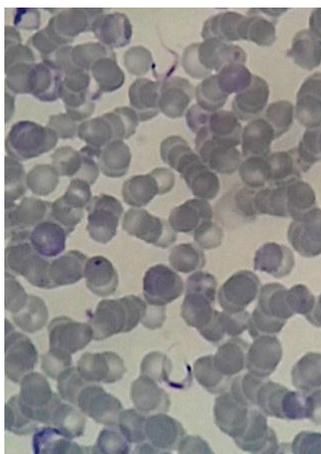
**Figura 2:** *T. cruzi* penetrando em célula hospedeira. Microscopia eletrônica de varredura. Original de Sérgio Schenkman.

Apresentando uma alta variabilidade genética, até os anos 80, as cepas de *T. cruzi* eram subdivididas em três grupos (zimodemas): I, II e Z3 (Rassi et al., 2010; Zingales, 2011). Com os avanços nas técnicas de

biologia molecular, pode-se confirmar que existem seis unidades discretas de digitação (DTU): *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) e *T. cruzi* VI (TcVI) cada uma delas apresenta características com base em sua distribuição geográfica, associações eco-epidemiológicas e manifestações clínicas da doença (Zingales et al., 2012). As cepas I (selvagem) e II (doméstica) são puras e as cepas III a VI são híbridas (Rassi et al., 2010; Zingales, 2011).

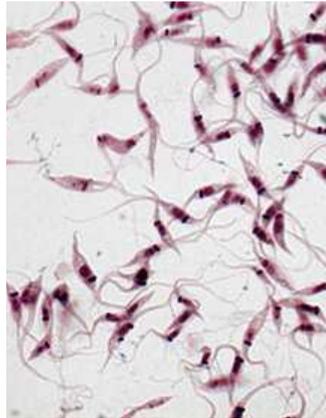
O parasita possui um ciclo evolutivo complexo e compreende diferentes estágios de desenvolvimento caracterizados pelas posições relativas do flagelo, cinetoplasto e núcleo; entre suas formas morfométricas estão:

- Tripomastigotas com 20  $\mu\text{m}$  é longa e fusiforme, apresenta cinetoplasto subterminal, constituindo a forma infectante sendo encontrado no sangue de mamíferos e no intestino posterior dos triatomíneos. Nos mamíferos são os agentes da infecção transmitida pelo sangue (Prata, 2001; Maya et al., 2007) **(Fig. 3)**.



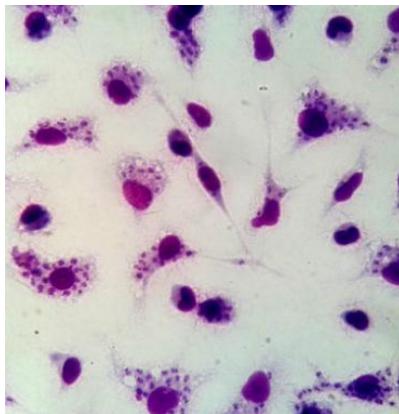
**Figura 3:** Observação microscópica do protozoário *T. cruzi* em sua forma tripomastigota sanguíneo. Original. Daiane Dias Ferreira

- Epimastigotas com 20  $\mu\text{m}$  também é longa e fusiforme, porém, o cinetoplasto é anterior ao núcleo, são as formas multiplicativas do parasita no intestino dos triatomíneos e predominam na cultura. Por isso, são as mais utilizadas nos estudos (Prata, 2001; Maya et al., 2007) **(Fig. 4)**.



**Figura 4:** Observação microscópica do protozoário *T. cruzi* em sua forma epimastigota. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

- Amastigotas com aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro são redondos e não apresentam flagelo, o cinetoplasto se mantém anterior ao núcleo. Multiplicam-se por meio de divisão binária no interior das células hospedeiras de mamíferos e ao produzir sua ruptura, as formas tripomastigotas são liberadas para a corrente sanguínea e podem mais uma vez invadir qualquer célula nucleada. Também podem ser cultivados em cultura de células musculares, fibroblastos e macrófagos, entre outras (Prata, 2001; Maya et al., 2007) (**Fig. 5**).



**Figura 5:** Observação microscópica de macrófagos infectados por *T. cruzi* em sua forma amastigota. Original de Daiane Dias Ferreira.

### 1.2.5 Ciclo Biológico

Os triatomíneos normalmente possuem hábitos noturnos e durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados com *T. cruzi*, ingerem as formas tripomastigotas circulantes que, após sofrerem multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo, são eliminadas nas fezes quando ocorre um novo repasto, podendo infectar novos hospedeiros vertebrados (Fig. 6).

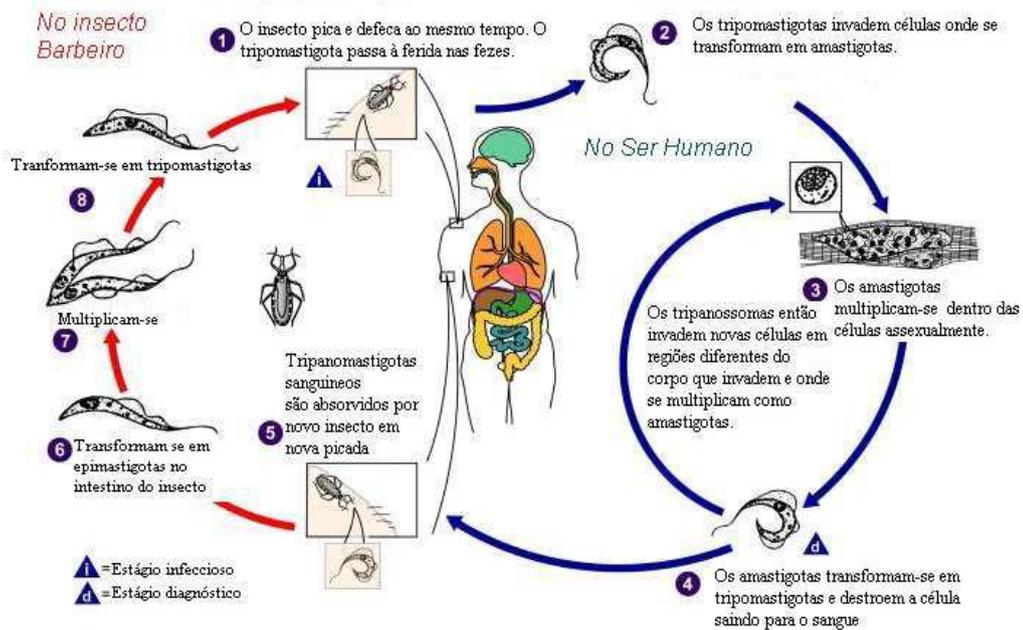


Figura 6: Ciclo de transmissão do *T. cruzi*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention, 2013.

A transmissão da doença para o homem e outros animais acontece quando o triatomíneo infectado com *T. cruzi*, durante o repasto sanguíneo libera nas fezes e urina formas tripomastigotas metacíclicas que penetram pela lesão da picada ou por membranas mucosas (Chagas, 1933; Brener et al., 2000). Sendo assim, ao coçar a região picada, o indivíduo ou animal desloca os parasitas para a circulação sanguínea (Rey, 2001). Uma vez, no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* invadem diferentes tipos celulares, principalmente do sistema fagocitário mononuclear incluindo os macrófagos aonde irão se multiplicar sob a forma de amastigotas (Costa et al., 2006).

Outras vias de infecção são: transmissão congênita, amamentação, via transfusional e também formas de transmissão excepcionais como, acidental em laboratório, por transplantes de órgãos, oral e sexual (Brener et al., 2000; Dias, 2006). Mais recentemente a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou seus dejetos ganhou destaque em 2005 no estado de Santa Catarina, associado ao consumo de caldo de cana (Stendel et al., 2005). Nesse episódio, segundo nota técnica do Ministério da Saúde (2007) 24 pacientes foram infectados, sendo que três evoluíram para óbito. Em 2006 no estado do Pará, 178 casos foram notificados e 11 confirmados pela ingestão da fruta açaí (Nóbrega et al., 2009). Já em 2010, mais 17 casos foram confirmados na região de Monte Alegre na zona rural em torno de Santa Izabel do Rio Negro Amazonas, também pelo consumo do açaí contaminado pelas fezes do barbeiro (Souza-Lima et al., 2013).

### **1.2.6 Manifestações Clínicas**

A doença de Chagas atinge cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina, entre as quais 30 a 40% têm ou irão desenvolver manifestações neurológicas (Py, 2011), cardiomiopatia, e/ou megassindromes digestivas (Rassi et al., 2010). A grande variabilidade na evolução da doença tem sido atribuída às respostas do hospedeiro e a heterogeneidade do parasita (Junqueira et al., 2010).

Após a entrada do parasita no organismo, ocorrem duas etapas fundamentais na infecção humana pelo *T. cruzi*, conhecidas como fase aguda e fase crônica (Ministério da Saúde, 2009). O período de incubação do *T. cruzi* pode variar de 3 a 112 dias, dependendo do modo de infecção (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). Sendo assim, a fase aguda dura de 4 a 8 semanas e se caracteriza pelo predomínio do parasita circulante na corrente sanguínea. Geralmente é assintomática ou oligossintomática, nesse último caso Marcondes e colaboradores (2000), relataram que a infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda está associada com anemia, hipoplasia da

medula óssea, trombocitopenia e leucopenia (Pereira e Navarro, 2013). Também são mencionadas, febre prolongada, mal-estar, hepato e/ou esplenomegalia e linfadenomegalia localizada na região da picada (sinal de Romaña ou chagoma de inoculação) (Rassi et al., 2010) **(Fig. 7)**.



**Figura 7:** Criança apresentando sinal de Romaña. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

A taxa de mortalidade pode variar de 5 a 10% nessa fase e geralmente envolve crianças que morrem de miocardite e/ou mieloencefalite (Murcia et al., 2013).

Segundo o Ministério da Saúde entre 2005 e 2009 foram notificados 455 casos da doença em fase aguda no Brasil, dos quais 389 (85,5%) ocorreram na região norte do país, sendo 310 (68,1%) no Pará e 29 (6,3%) casos no estado do Amazonas (Ministério da Saúde, 2013; Monteiro et al., 2010).

O número anual de casos agudos relatados entre 2000-2012 em El Salvador chegou a 731 entre crianças e adultos com mais de 13 anos. Embora o número anual de pacientes com doença de Chagas aguda tenha diminuído de 117 em 2007 para 16 em 2012, a razão para o grande número de casos agudos em El Salvador não é clara, uma vez que, a transmissão oral da doença não tem sido relatada no país (Sasagawa et al., 2014).

A fase crônica da doença é caracterizada pela baixa incidência de parasitas circulantes na corrente sanguínea e costuma ser assintomática, o paciente não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico ou resultados anormais no eletrocardiograma (ECG) de repouso e no estudo radiológico de tórax, esôfago e cólon, cerca de 60% dos pacientes apresenta

esse quadro conhecido como forma indeterminada, que se mostra como o melhor prognóstico clínico para os pacientes crônicos, uma vez que, não existe comprometimento cardíaco ou digestivo podendo perdurar pelo resto da vida (Soares-Sobrinho et al., 2007; Pereira e Navarro, 2013).

No entanto, de 20 a 40% dos pacientes evoluem para a forma cardíaca e/ou digestiva (Soares-Sobrinho et al., 2007; Sathler-Avelar et al., 2009). A patogênese da forma cardíaca ocorre em cerca de 30% dos casos e segundo Marin-Neto e colaboradores (2007) é caracterizada por infiltrado inflamatório, morte celular e fibrose intersticial que levam a distúrbios do sistema de condução cardíaca, arritmia ventricular e miocardite, além de distúrbios microvasculares que podem resultar em morte súbita. O estudo realizado por Coura (2009) demonstrou que a persistência do parasita nos tecidos do hospedeiro desempenha um papel importante na agressão do miocárdio, sendo assim, acredita-se que eliminando o parasita, ou ao menos reduzindo sua quantidade pode-se melhorar a eficácia da resposta imune e reduzir a progressão da doença (Marin-Neto et al., 2009; Sosa-Estani et al., 2009).

A prevalência da forma digestiva ocorre em 10% dos casos e geralmente resulta em dilatação do trato gastrointestinal que frequentemente, evolui para megacólon (constipação crônica, dor abdominal e obstrução) ou megaesôfago (disfagia, dor no peito e regurgitação) (Lescure et al., 2010). De acordo com Oliveira e colaboradores (2009) há uma estimativa de 300 mil indivíduos com megacólon. As disfunções do esôfago também podem estar associadas às alterações no trânsito intestinal, que se torna cada vez mais lento levando a hipertrofia muscular e em casos mais exacerbados, a dilatação do órgão (Rey, 2008).

### **1.2.7 Diagnóstico**

São considerados para o diagnóstico da doença de Chagas critérios parasitológicos e sorológicos. O parasitológico é definido pela presença de parasitas circulantes no sangue periférico. Por sua vez, o critério sorológico

é baseado na presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue (Ministério de Saúde, 2009).

O diagnóstico clínico parasitológico é confirmado, durante a fase aguda, pela presença do sinal de Romaña ou chagoma, além da utilização do teste de gota espessa que tem sido frequentemente utilizado em estudos epidemiológicos de campo, em função do seu baixo custo e da fácil visualização do parasita em quantidades expressivas na circulação periférica (Pereira e Navarro, 2013).

Também é recomendado que, testes utilizando métodos de concentração como, Strout, micro hematócrito e creme leucocitário sejam realizados na presença de sintomas por mais de 30 dias (Ministério da Saúde, 2009). Os exames sorológicos complementam os parasitológicos e devem ser sempre colhidos em casos suspeitos ou confirmados da doença em fase aguda. As metodologias utilizadas são a hemaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI) e o método imunoenzimático (ELISA), (Ministério da Saúde, 2009).

No entanto, os testes sorológicos rápidos, como o ensaio Stat Pack têm atraído a atenção dos pesquisadores, uma vez que permitem um diagnóstico de portadores crônicos da doença que é caracterizada pela baixa parasitemia, o que dificulta a eficiência de identificação direta do parasita no sangue (Chippaux et al., 2010). Nessa fase outros métodos são utilizados como, o xenodiagnóstico, ELISA, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, quimioluminescência, e TESA–blot, além da PCR. Mais recentemente, foi desenvolvida uma variante da PCR convencional, denominada PCR em tempo real que permite além da detecção do DNA do parasita, a quantificação de cópias da sequência do DNA ou RNA alvos (Qvarnstrom et al., 2012; Pereira e Navarro, 2013; Duffy et al., 2013). A reativação da doença pode ocorrer em casos de imunossupressão, sendo assim o diagnóstico laboratorial baseia-se na positividade dos testes por visualização do parasita no sangue periférico, líquido ou outros líquidos corporais, além dos testes sorológicos citados anteriormente.

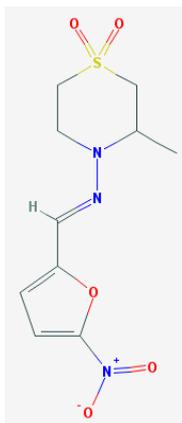
### 1.2.8 Tratamento

A terapia utilizada no tratamento da doença baseia-se na eliminação do parasita durante a fase aguda e na atenuação dos sintomas durante a fase crônica com o uso de cardiotônicos e antiarrítmicos, para o coração, ou através de cirurgias corretivas do esôfago e do cólon (Kirchhoff, 1996).

Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo dessa parasitose, o seu tratamento apresenta ainda hoje muitos problemas (Santello, 2009). O principal obstáculo para o tratamento da doença de Chagas é o uso de medicamentos tóxicos e pouco eficazes, capazes de eliminar o parasita no período inicial da doença, porém com índices de cura muito baixos em sua fase crônica (Ministério da Saúde, 2009).

No final da década de 60 surgiram, respectivamente, o nifurtimox e o benznidazol, no entanto, nenhum destes compostos apresenta estudos comprobatórios de sua efetividade durante a fase crônica da doença, além dos sérios efeitos colaterais que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados (Coura e Castro, 2002; Marin-Neto et al., 2009). A administração é feita por um longo período (30-60 dias) e não garante o sucesso do tratamento, já que existe uma grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita a ação destes fármacos, além da resistência a ambos compostos já terem sido descritas (Carrilero et al., 2011).

O nifurtimox é um derivado nitrofurânico que apresenta atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas do parasita e que foi amplamente empregado no tratamento da doença (Coura et al., 2002) (**Fig. 8**).

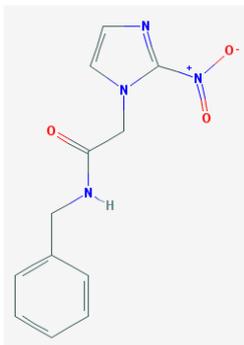


**Figura 8:** Estrutura química do nifurtimox (PubChem, 2013).

Seu mecanismo de ação envolve a produção de radicais livres: superóxido, peróxido de hidrogênio e metabólitos eletrolíticos que levam a intoxicação devido ao aumento do consumo de  $O_2$  pelo parasita e a formação desses radicais, como consequência, os tecidos do hospedeiro também acabam sendo lesados (Apt e Zulantay, 2011).

No entanto, a partir da década de 80 o medicamento teve sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais que apresentava como, anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e complicações digestivas (náuseas, vômitos, cólicas intestinais e diarreia) estando atualmente fora do mercado (Soares-Sobrinho et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Marin-Neto et al., 2009).

Por outro lado, o benznidazol é um derivado nitroimidazólico que se mostrou mais efetivo que o nifurtimox contra formas tripomastigotas do parasita (Coura et al., 2002) (**Fig. 9**).



**Figura 9:** Estrutura química do benznidazol (PubChem, 2013).

Sua ação antiparasitária não envolve danos oxidativos e sim, a inibição da síntese de proteínas e de RNA de formas extracelulares e intracelulares presentes no hospedeiro parasitado originando a degradação de macromoléculas (Maya et al., 2006; Oliveira et al., 2008).

Sua apresentação é feita na forma de comprimidos de 100 mg (adultos) e 12,5 mg (crianças) e deve ser administrado diariamente por via oral durante 60 dias. A dose varia de acordo com a idade e o peso do paciente, sendo que em adultos a dose recomendada é de 5 a 7 mg/kg/dia e em crianças a dose varia de 5 a 10 mg/kg/dia (Ministério da Saúde, 2009).

Apesar de sua eficácia no tratamento da fase aguda, o medicamento apresenta vários efeitos colaterais que vão desde reações de hipersensibilidade a depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (Coura et al., 2002; Dias et al., 2009). A contra indicação é sugerida em casos de pacientes com alcoolismo crônico, pessoas com doença hepática, nefropatias e doenças sanguíneas graves, gestantes e lactantes só deverão utilizar o medicamento com indicação absoluta do médico (Apt e Zulantay, 2011).

Embora não seja o fármaco ideal, o benznidazol é o medicamento de escolha para o tratamento da doença de Chagas e é o único comercializado em diversos países. O conhecimento aprofundado sobre as propriedades físico-químicas e biológicas deste fármaco poderão possibilitar o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença (Soares-Sobrinho et al., 2007).

Nesse âmbito, novas terapias vêm sendo estudadas para o tratamento da doença de Chagas. Entre os novos fármacos que estão sendo testados o posaconazol, tem mostrado resultados promissores no tratamento de doentes em fase aguda e crônica, pois se mostrou eficaz na eliminação de formas amastigotas de células cardíacas (Diniz et al., 2013). Outros derivados do triazol (inibidores da biossíntese do ergosterol), como ravuconazol, também estão sendo estudados (Lescure et al., 2010). Porém, apenas os fármacos alopurinol, itraconazol, fluconazol e posaconazol foram submetidos a ensaios clínicos (Solari et al., 1993). Além disso, tratamentos

combinados, como nifurtimox mais benznidazol, nifurtimox ou benznidazol mais alopurinol, e nifurtimox ou benznidazol mais cetoconazol, fluconazol ou itraconazol foram propostos (Coura, 2009; Muñoz et al., 2011; Cencig et al., 2012; Veiga-Santos et al., 2012), porém não demonstraram eficácia superior ao tratamento atual.

Em 2009, o DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) juntamente com a Eisai Co. Ltd uma empresa farmacêutica japonesa uniram esforços para desenvolver um novo fármaco para a doença de Chagas. O E1224 é um pró-fármaco que se converte no ravuconazol, metabólito ativo no organismo humano, levando à melhoria da absorção e de sua biodisponibilidade. A fase II do estudo começou em julho de 2011, em Cochabamba e Tarija, na Bolívia, país que apresenta o maior número de pacientes com a doença no mundo (DNDi, 2014).

Apesar dos avanços na identificação de novos candidatos a fármacos contra a doença de Chagas, a proposta terapêutica manteve-se a mesma durante mais de 40 anos e até hoje não existe nenhum tratamento eficaz para os pacientes em fase crônica (Pereira e Navarro, 2013).

### **1.3 Reposicionamento de Fármacos**

Em 1998 a Organização Mundial da Saúde estipulou algumas exigências para a busca por um fármaco ideal como: cura parasitológica de casos agudos e crônicos, ação eficaz com uma única dose ou poucas doses, custo reduzido, poucos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos, hospitalização desnecessária para o tratamento, além de nenhuma indução a resistência. Porém, na prática, conhecendo as limitações de administração de um fármaco em diferentes condições de campo, diferentes cepas, diferentes DTUs, complexidade da pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco, estes objetivos parecem estar distantes de uma realidade.

Sendo assim, a busca por novas terapias foram introduzidas no tratamento de determinadas doenças pelos seguintes processos: encontro

ao acaso, triagem empírica, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular de compostos já existentes, síntese, reposicionamento de fármacos, associação de fármacos, entre outros (Korolkovas, 1982; Tempone et al., 2011).

A busca por novos fármacos exigem um longo tempo de estudo, grandes recursos financeiros e ainda um elevado risco de perda dos investimentos. Dentre as abordagens mais utilizadas, o reposicionamento de fármacos (*drug repositioning, therapeutic switching*) e a triagem (*screening*) de bibliotecas químicas de compostos sintetizados, ganharam destaque e se tornaram prioridade nos programas de *Drug Discovery*, tanto na indústria como no setor acadêmico (Bajorath, 2002; Bleicher et al., 2003; Ekins et al., 2011).

Frente à problemática terapêutica da doença de Chagas, a triagem de fármacos desenvolvidos para outros propósitos disponíveis na clínica médica para tratar outras patologias, vem se apresentando como uma das abordagens mais rápidas e eficazes para a introdução de novas terapias (Ashburn e Thor, 2004; Dueñas-González et al., 2008).

Pode-se citar alguns exemplos bem sucedidos de reposicionamento de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, como é o caso da pentamidina e da anfotericina B, utilizados primeiramente para tratar infecções fúngicas (Croft et al., 2006) e da miltefosina, desenvolvida para tratamento de câncer de mama (Sundar et al., 2002). Exemplos mais recentes incluem plerixafor, estudado como um inibidor do HIV, mas posteriormente lançado em 2009 como mobilizador de células-tronco hematopoiéticas no tratamento do mieloma múltiplo, além do milnacipran, inicialmente desenvolvido e lançado como um antidepressivo e, posteriormente, aprovado para o tratamento da fibromialgia (Sleigh e Barton, 2010).

Alguns exemplos de reposicionamento de medicamentos aprovados com sucesso para novas indicações podem ser observados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Reposicionamento de fármacos em uso clínico e em estudos pré-clínicos.

Fármaco	Uso original	Novo uso	Referências
<b>nitazoxanida</b>	infecções por <i>C. parvum</i> e <i>Giardia</i>	tratamento da tuberculose; anti- <i>leishmania</i>	Oldfield, 2010
<b>aprepitant</b>	náusea: receptor antagonista nk-1	cryptosporidiose em imunocomprometidos; infecção resistente de hiv-1: induz regulação negativa de ccr5 em macrófagos	Manak, et al. 2010; Wang et al, 2007
<b>amiodarona</b>	anti-arritmico classe iii	doença de chagas: bloqueador da síntese de ergosterol	Oldfield, 2010
<b>dapoxetina</b>	analgésico e antidepressivo	ejaculação prematura	Ashburn & Thor, 2004
<b>milnacipran</b>	antidepressivo	fibromialgia	Ashburn & Thor, 2004
<b>clorpromazina</b>	antihistamínico	tranqüilizante	Ashburn & Thor, 2004
<b>galantamina</b>	anestésico	Alzheimer	Ashburn & Thor, 2004
<b>tamoxifeno</b>	anti-estrogênio	anti- <i>Leishmania amazonensis</i>	Ashburn & Thor, 2004
<b>trimetrexato</b>	antifolato usado em infecções de <i>P. carinii</i> em pacientes com HIV	inibidor da dhfr de <i>T. cruzi</i>	Ekins et al, 2011
<b>finasterida</b>	hiperplasia da próstata	perda de cabelo	Ashburn & Thor, 2004
<b>raloxifeno</b>	antiestrogênio	osteoporose	Ashburn & Thor, 2004
<b>riluzol</b>	esclerose amiotrófica lateral	testes clínicos para tratamento de melanoma	Ekins et al, 2011
<b>sertralina</b>	antidepressivo	neuroprotetor em atrofia cerebral	Peng, et al. 2008
<b>itraconazol</b>	antifúngico	inibidor de angiogênese	Chong, et al. 2007
<b>acrisorcina</b>	antifúngico	anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	Shahinas, et al 2010
<b>harmina</b>	antitumoral	anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	Shahinas et al 2010
<b>acetofenazina</b>	antipsicótico	antagonista de receptor de androgênio humano	Ekins et al, 2011

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que tem agregado valor ao portfólio de produtos da indústria farmacêutica, bem como o aumento da capacidade de entidades não industriais (acadêmico e governamental) para trazer novas e acessíveis opções de tratamento para uma série de doenças negligenciadas como é o caso da doença de Chagas (O'Connor e Roth, 2005).

Portanto, a implementação em larga escala de estratégias de reposicionamento no futuro, mostra-se como uma oportunidade para explorar o potencial de farmacopeias existentes e inaugurar uma situação que irá gerar benefícios tanto para os setores públicos e privados, como para os pacientes em todo o mundo (Padhy e Gupta, 2011).

#### **1.4 Justificativa e Relevância**

Endêmica em 21 países da América Latina, além de estar em expansão para outros países não endêmicos, a doença de Chagas tornou-se um grave problema de saúde pública, já que essa enfermidade afeta principalmente áreas pobres, onde o acesso aos cuidados médicos e aos medicamentos são limitados (Tanowitz et al., 2011; Nunes et al., 2013).

Atualmente a terapêutica disponibilizada possui inúmeras desvantagens como: longos esquemas posológicos de administração, alto custo e toxicidade elevada. Além disso, a resistência à medicação é outra dificuldade, pois os pacientes não respondem ao tratamento como esperado (Mejia et al., 2012). Sendo assim, a busca por tratamentos alternativos para a doença de Chagas é de extrema importância nos dias atuais, e o reposicionamento de fármacos tem se mostrado uma ferramenta rápida e eficaz para a introdução de novas terapias.

A escolha dos fármacos neste projeto foi baseada na seleção aleatória de 54 compostos de diferentes classes terapêuticas aprovados em uso clínico para outras enfermidades. Os fármacos que demonstraram atividade

anti-*T. cruzi* foram selecionados para a continuação dos experimentos e os dois com melhor resultado estão representados nesse estudo.

Com base nos relatos de atividade *in vivo* contra *L. (L) donovani*, (Zhang et al., 2010) e de estudos prévios do nosso grupo contra *L. (L) infantum* (Mesquita et al., 2013) o fármaco nitazoxanida foi escolhido para investigação de sua atividade *in vivo* contra *T. cruzi*. A escolha da sertralina para os estudos *in vivo* e *in vitro* se deu pelo ineditismo de sua atividade contra esse parasita. Além disso, a associação entre os dois fármacos também foi analisada.

## 2 OBJETIVOS

**Gerais:** Utilizando o conceito de reposicionamento de fármacos, este projeto visou identificar fármacos aprovados com potencial atividade anti-*T. cruzi* em modelos *in vitro* e experimentais.

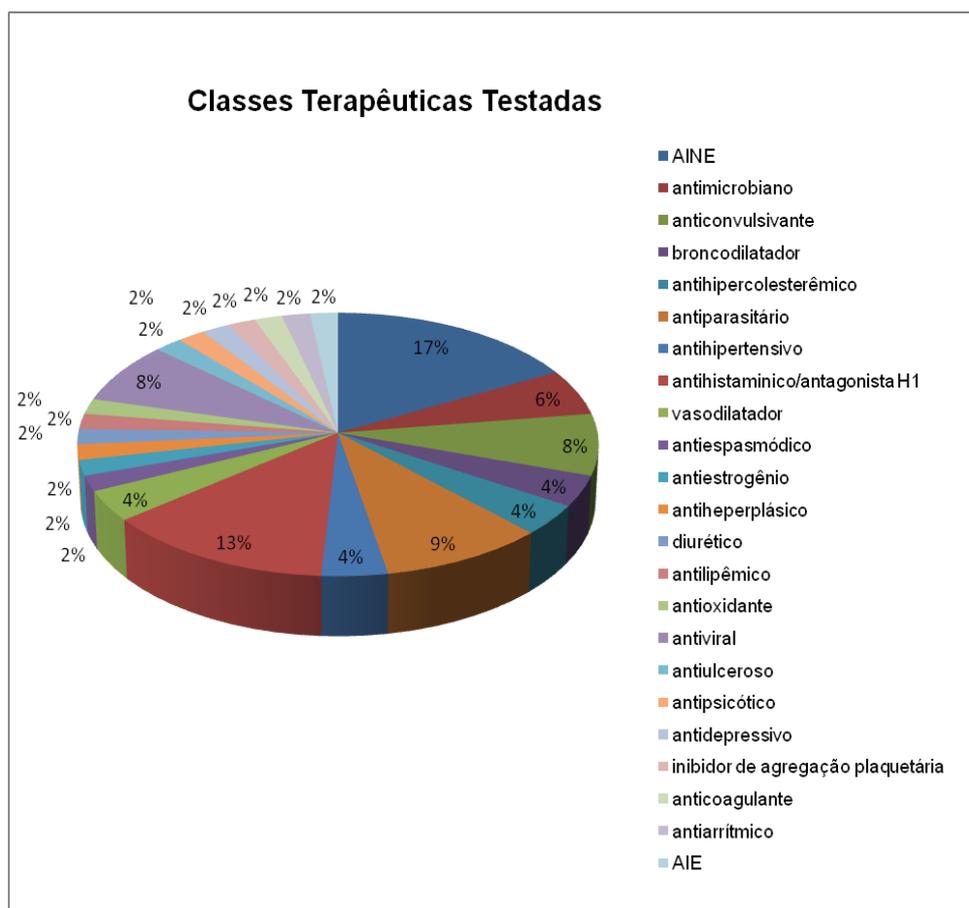
### **Específicos:**

- 1- Realizar a triagem de uma biblioteca composta por 54 fármacos de diferentes classes terapêuticas aprovados em uso clínico para outras patologias.
- 2- Avaliar a Concentração Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) *in vitro* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* dos fármacos que apresentaram atividade a partir da triagem e investigar a atividade contra formas amastigotas de fármacos mais promissores.
- 3- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos fármacos que apresentaram CE<sub>50</sub> abaixo de 100 µM em células de mamífero NCTC clone 929.
- 4- Realizar a associação *in vitro* do fármaco nitazoxanida com o fármaco sertralina em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.
- 5- Avaliar o potencial de tratamento *in vivo* dos fármacos sertralina e nitazoxanida, isoladamente, em modelo de camundongo Swiss infectado com *T. cruzi*.
- 6- Avaliar a parasitemia em modelo murino por meio da técnica de PCR em tempo real e comparar os resultados com o método clássico de Brener, utilizando microscopia óptica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Fármacos Estudados

Foram submetidos à triagem anti-*T. cruzi* 54 fármacos de 23 classes terapêuticas disponíveis na clínica médica para outras patologias. A variabilidade dos fármacos pode ser observada abaixo (**Fig. 10**).

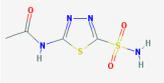
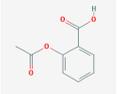
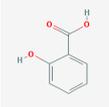
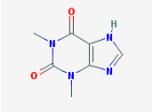
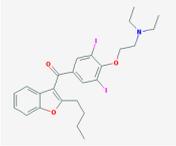
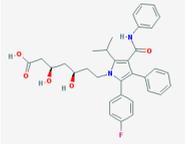
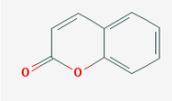
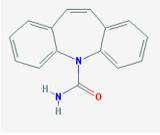
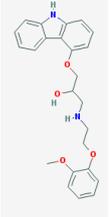


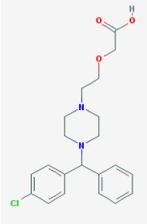
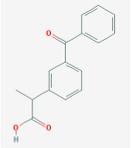
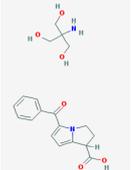
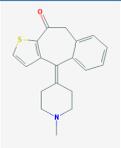
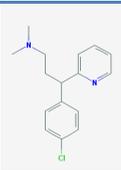
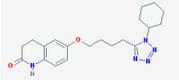
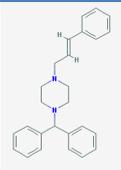
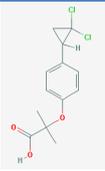
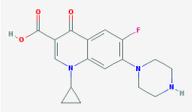
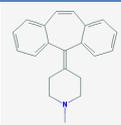
AINE: analgésico anti-inflamatório não esteroidal; AIE: analgésico anti-inflamatório esteroidal

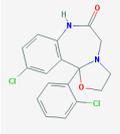
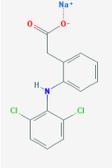
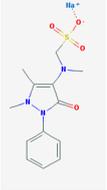
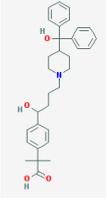
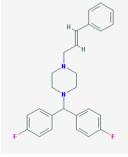
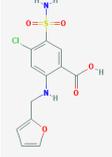
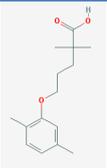
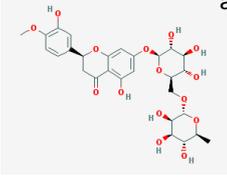
**Figura 10:** Diferentes classes terapêuticas utilizadas na triagem, representadas em porcentagem.

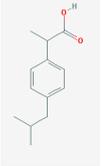
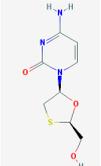
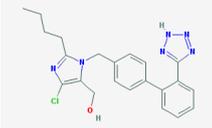
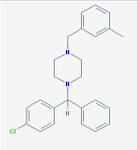
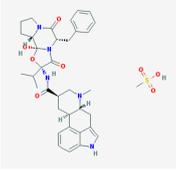
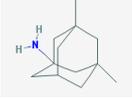
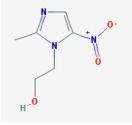
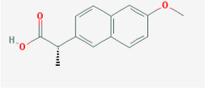
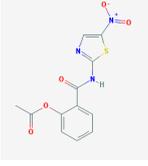
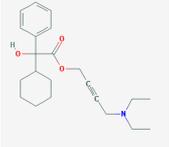
A **tabela 2** apresenta de forma detalhada os fármacos estudados, suas respectivas estruturas, classes terapêuticas, uso clínico, assim como um levantamento bibliográfico de suas possíveis atividades anti-*T. cruzi* em formas amastigotas e tripomastigotas da cepa Y.

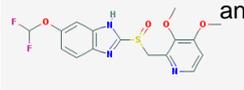
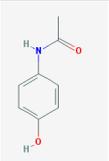
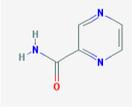
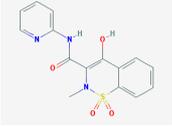
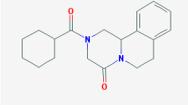
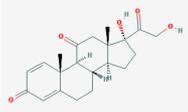
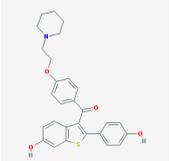
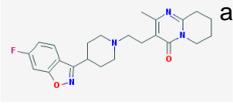
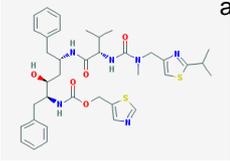
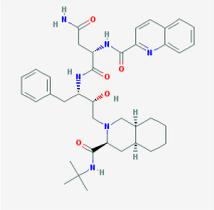
Tabela 2: Fármacos estudados contra formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

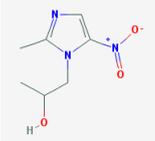
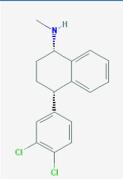
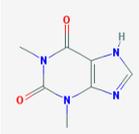
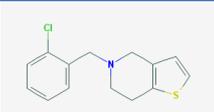
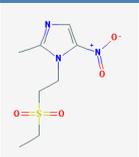
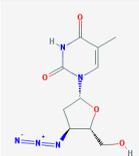
Fármaco	Estrutura Química	Classe Terapêutica	Uso Clínico	PubMed/Web of Science
<b>acetazolamida</b>		anticonvulsivante, diurético	glaucoma	NP
<b>ácido acetilsalicílico</b>		AINE	analgésico	NP
<b>ácido salicílico</b>		antimicrobiano	anti-acne	NP
<b>aminofilina</b>		broncodilatador	asma	NP
<b>amiodarona</b>		antiarrítmico	arritmias e angina	Veiga-Santos et al, 2012
<b>atorvastatina</b>		antihipercolesterêmico	redução do colesterol	NP
<b>benzopirona</b>		anticoagulante	varizes, profilaxia de trombozes e hemorróida	NP
<b>carbamazepina</b>		anticonvulsivante	epilepsias	NP
<b>carvedilol</b>		antihipertensivo	hipertensão arterial e angina	NP

<b>cetirizina</b>		antihistaminico/ antagonista H1	antialérgico	NP
<b>cetoprofeno</b>		AINE	analgésico	NP
<b>cetorolaco de trometamina</b>		AINE	analgésico	NP
<b>cetotifeno</b>		antihistaminico/ antagonista H1	antiasmático	NP
<b>clorfeniramina</b>		antihistaminico/ antagonista H1	antialérgico	NP
<b>cilostazol</b>		vasodilatador	inibidor plaquetário	NP
<b>cinarizina</b>		antihistaminico/ antagonista H1	distúrbios circulatórios e de equilíbrio	NP
<b>ciprofibrato</b>		Antihipercolesteremico antilipêmico	redução do colesterol	NP
<b>ciprofloxacino</b>		antimicrobiano	antimicrobiano	NP
<b>ciproheptadina</b>		antihistaminico/ antagonista H1	anti-alérgico	NP

<b>cloxazolam</b>		anticonvulsivante benzodiazepínico	distúrbios emocionais, comportamentais e do sono	NP
<b>diclofenaco de sódio</b>		AINE	analgésico	NP
<b>dipirona sódica</b>		AINE	analgésico	NP
<b>fexofenadina</b>		antihistaminico/ antagonista H1	antialérgico	NP
<b>finasterida</b>		antiheperplásico	hiperplasia prostática benigna	NP
<b>fluranizina</b>		anticonvulsivante, bloqueador de canal de cálcio, antagonista H1	enxaqueca	NP
<b>furosemida</b>		diurético	tratamento de edema e hipertensão	NP
<b>gemfibrozila</b>		antilipêmico	redução dos níveis lipídicos	NP
<b>hesperidina</b>		antioxidante	auxiliar no tratamento varizes	NP

<b>ibuprofeno</b>		AINE	analgésico	NP
<b>lamivudina</b>		antiviral	hepatite b e hiv	NP
<b>losartana</b>		antihipertensivo	hipertensão	NP
<b>meclisina</b>		antiemético/ antihistaminico/ antagonista H1	vertigem, náusea e vômito	NP
<b>mesilato de diidroergocristina</b>		antagonista adrenérgico, vasodilatador	vertigem, labirintite	NP
<b>memantina</b>		antiparkinsoniano	Parkinson	NP
<b>metronidazol</b>		antiparasitário	infecções causadas por protozoários	NP
<b>naproxeno</b>		AINE	analgésico	NP
<b>nitazoxanida</b>		antiparasitário, antiviral	infecções causadas por protozoários, helmintos e rotavírus	Chan-Bacab et al, 2009; Navarrete- Vasquez et al, 2011
<b>oxibutinina</b>		antiespasmódico	relaxante do trato urinário	NP

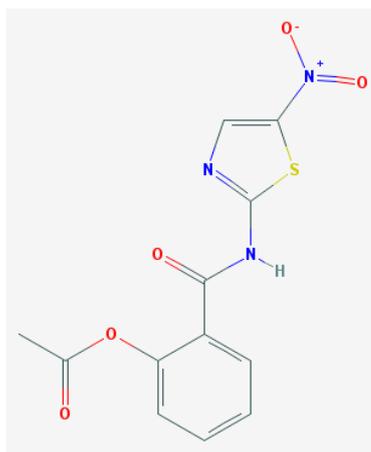
<b>pantoprazol</b>		antiulceroso	úlceras gástricas	NP
<b>paracetamol</b>		AINE	analgésico	NP
<b>pirazinamida</b>		antimicrobiano	tuberculose	NP
<b>piroxicam</b>		AINE	analgésico	NP
<b>praziquantel</b>		antiparasitário	anti-helmíntico	NP
<b>prednisona</b>		AIE	anti-inflamatório	NP
<b>raloxifeno</b>		antiestrogênio	prevenção de osteoporose	NP
<b>risperidona</b>		antipsicótico	esquizofrenia	NP
<b>ritonavir</b>		antiviral	HIV	NP
<b>saquinavir</b>		antiviral	HIV	NP

<b>secnidazol</b>		antiparasitário	infecções causadas por protozoários	NP
<b>sertralina</b>		antidepressivo	depressão e TOC	NP
<b>teofilina</b>		broncodilatador	antiasmático	NP
<b>ticlopidina</b>		inibidor de agregação plaquetária	acidente vascular cerebral	NP
<b>tinidazol</b>		antiparasitário	infecções causadas por protozoários e bactérias	NP
<b>zidovudina</b>		antiviral	HIV	NP

NP: não publicado; AINE: anti-inflamatório não esteroidal; AIE: anti-inflamatório esteroidal

Dentre os fármacos estudados, a **nitazoxanida** e a **sertralina**, foram escolhidas, uma vez que, apresentaram melhores resultados contra as formas amastigotas do parasita para avaliação do potencial anti-*T. cruzi* em modelo experimental murino, assim como para estudos de associação de fármacos. Desta forma, abaixo descrevemos com maior detalhamento estes fármacos.

A nitazoxanida, conhecida comercialmente como Alinia ou Annita, é um derivado nitrotiazolilsalicilamida sintético desenvolvido para o tratamento de diarreias causadas pelos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* em pacientes a partir de um ano de idade (Andrade et al., 2011; Navarrete-Vazquez et al., 2011) (**Fig. 11**).



**Figura 11:** Estrutura química da nitazoxanida (PubChem, 2013).

Estudos realizados desde 1994 mostram sua atividade contra um amplo espectro de bactérias, protozoários e helmintos que infectam o trato gastrointestinal do homem como, *Entamoeba histolytica*, *Clostridium perfringense*, *Helicobacter pylori* (Cedillo-Rivera et al., 2002; Guttner et al., 2003; Freeman et al., 2011).

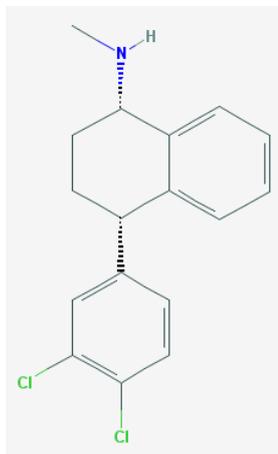
Recentemente sua atividade foi descrita contra *Leishmania (L.) donovani* em modelo experimental murino, no entanto, o tratamento por via oral só demonstrou efetividade em altas doses de 400 mg/kg (Zhang et al., 2010). A efetividade do fármaco no tratamento e citoproteção contra rotavírus e norovírus também já foi descrita (Rossingol et al., 2006; Teran et al., 2009).

Segundo Hoffman e colaboradores (2007) o fármaco inibe uma enzima fundamental para o metabolismo energético destes microrganismos, a piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). Sendo assim, o mecanismo de ação antiprotozoário deve-se à interferência com essa enzima que é dependente da reação de transferência dos elétrons essencial ao seu metabolismo (Ballard et al., 2010).

Em humanos, este fármaco é rapidamente transformado no metabólito ativo tizoxanida. A eliminação e excreção ocorrem pela urina, bile e fezes e sua meia vida é de 1,9 horas (Balderas-Acata et al., 2011).

Outro fármaco alvo deste estudo foi a **sertralina** que é um inibidor da recaptação da serotonina e é largamente utilizada no tratamento de

pacientes com depressão e as desordens de ansiedade severas, como transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno do pânico, transtorno de estresse pós-traumático, e transtorno de ansiedade social (fobia social), (Duan et al., 2008, DrugBank, 2013) **(Fig. 12)**.



**Figura 12:** Estrutura química da sertralina (PubChem, 2013).

Atualmente tem sido estudada como um potencial fármaco para o tratamento da meningite causada por *Cryptococcus* spp. (Zhai et al., 2012), assim como em estudos experimentais em *Leishmania (L.) donovani*, demonstrando eficácia de até 72% em doses de 10 mg/kg divididas em 2 doses semanais por 30 dias (Palit e Ali, 2008).

De acordo com Kumar e Kumar (2009), ela apresenta efeitos neuroprotetores e antioxidantes, estimulando a neurogênese, e aumentando os níveis de proteína antiapoptóticas. Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas o fármaco parece inibir seletivamente a recaptação da serotonina na membrana pré-sináptica aumentando sua concentração no sistema nervoso central. Sugere-se que estas modificações sejam responsáveis pela observação do efeito clínico geral de aumento do humor e diminuição da ansiedade observada durante a administração a longo prazo do medicamento (DrugBank, 2013). O fármaco é extensivamente metabolizado pelo homem, e seus metabólitos resultantes são excretados na urina e fezes em quantidades semelhantes. Sua meia vida para homens e mulheres jovens e idosos varia de 22 a 36 horas (DrugBank, 2013).

### 3.2 Reagentes e compostos sintéticos

Alamar Blue® (resazurin), Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) sem vermelho de fenol, meio 199 (M-199) e tampão fosfato-salina (*phosphate-buffered saline* - PBS) foram adquiridos da Sigma. Dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol e Giemsa foram obtidos da Merck. Soro Fetal Bovino (SFB) adquirido da GIBCO. Cremofor EL da Fluka Biochemika. Os reagentes utilizados para PCR (iniciadores e TaqMan Master Mix) foram adquiridos da Applied Biosystems. Os fármacos utilizados no estudo foram cedidos pelo Professor Dr. Humberto G. Ferraz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos da Sigma.

### 3.3 Parasitas, células de mamífero e animais de experimentação

#### 3.3.1 Manutenção do parasita

***In vivo:*** Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) do Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia. As formas tripomastigotas foram mantidas em camundongos Swiss (*Mus musculus*) por aproximadamente 10 a 12 dias. Os animais foram eutanasiados em câmara de gás CO<sub>2</sub> e o sangue retirado por punção cardíaca em tampão citrato de sódio (3,8%). Após centrifugação de 3 minutos a 3.000 RPM, o sangue foi mantido em banho Maria a 37°C durante 12 minutos, o sobrenadante foi colhido e 10 µL separados para contagem em câmara de Neubauer (Pereira-Chioccola, 1998). A infecção ocorreu por via intraperitoneal com passagens de 1x10<sup>5</sup> tripomastigotas/animal.

***In vitro:*** As formas tripomastigotas foram cultivadas em células LLC-MK2 com meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB a temperatura de 37°C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> (Kesper et al., 2000; Reimão et al., 2008).

Tripomastigotas isolados de *T. cruzi* foram utilizados para a triagem *in vitro* e infecção de macrófagos para obtenção das formas amastigotas.

### **3.3.2 Células de mamífero NCTC**

Células de tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929, do American Type Culture Collection (ATCC CCL1), foram fornecidas pela Seção de Cultura Celulares do Instituto Adolfo Lutz, SP e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer à -70 °C. Posteriormente foram mantidas em meio M-199 suplementado com 10% SFB, sob a temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3.3 Animais de experimentação**

Os animais foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Camundongos Swiss machos foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas/animal de *T. cruzi* para manutenção da cepa e realização dos experimentos *in vivo* e as fêmeas utilizadas para obtenção de macrófagos peritoneais para realização dos ensaios com as formas amastigotas intracelulares. Todos os procedimentos realizados com animais tiveram aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (CEUA-IAL/Pasteur nº 03/2011).

## **3.4 Triagem da biblioteca de fármacos**

### **3.4.1 Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>)**

Os 54 fármacos utilizados foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e incubados com os parasitas

para se determinar as respectivas  $CE_{50}$ . A concentração do solvente não ultrapassou 0,5% para não causar danos aos parasitas.

Os fármacos foram diluídos em série utilizando-se meio RPMI-1640, sem adição de antibióticos em placas de 96 poços e em seguida formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitas/poço. As placas foram mantidas a temperatura de 37°C em estufa com 5% de  $CO_2$  durante 24 horas. Após esse período para a determinação da viabilidade dos parasitas, foi adicionado 20  $\mu$ L de Alamar Blue® a 10%. As placas permaneceram incubadas por mais 20 horas sob as mesmas condições.

Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 570 nm (Gehrke et al., 2013). Como controle positivo (100% de células mortas), utilizou-se o fármaco padrão benznidazol, devido sua utilização na terapia clínica, e como controle (100% de células vivas), utilizaram-se as células não tratadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.4.2 Ensaio de citotoxicidade**

A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se células NCTC (clone 929), na concentração de  $6 \times 10^4$  células/poço. As células foram incubadas com os fármacos ativos que apresentaram  $CE_{50}$  abaixo de 100  $\mu$ M. A diluição em série ocorreu com meio M-199 e 10% SFB em placas de 96 poços. As células foram mantidas incubadas durante 48 horas em estufa a 37°C com 5% de  $CO_2$  e em seguida, adicionou-se 20  $\mu$ L de Alamar Blue® a 10%. Incubou-se por mais 20 horas e a leitura foi realizada da mesma forma descrita anteriormente para tripomastigotas. Benznidazol também foi utilizado como controle positivo (100% de células mortas) e como controle (100% de células vivas), utilizou-se células não tratadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para avaliar o Índice de Seletividade (IS) dos fármacos em estudo, utilizou-se a seguinte razão:

**IS=** CC<sub>50</sub> em células de mamífero/CE<sub>50</sub> em tripomastigotas e/ou amastigotas

### **3.4.3 Ensaio com formas amastigotas**

Macrófagos peritoneais foram colhidos a partir da cavidade peritoneal de camundongos Swiss fêmeas por lavagem com meio RPMI-1640 sem fenol red e suplementado com SFB a 10%. As células foram semeadas em placas de 16 poços (NUNC®) e mantidas durante 18 horas no mesmo meio a 37°C na estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. As células não aderentes foram removidas por duas lavagens com meio RPMI-1640. Em seguida, as células foram infectadas com 1x10<sup>6</sup> tripomastigotas/poço durante 4 horas. Em seguida, adicionou-se os fármacos que apresentaram Índice de Seletividade maior que 5 diluídas seriadamente em base 2. As formas intracelulares do parasita permaneceram incubadas durante 42 horas para obtenção do CE<sub>50</sub> em amastigotas.

Ao final, as lâminas de vidro foram fixadas com metanol durante 5 minutos e coradas com Giemsa por 7 minutos para observação em microscópio de luz. A carga parasitária foi definida por meio da contagem de 100 macrófagos/poço avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle “100% infectado” macrófagos não tratados e como controle “0% infectado” macrófagos tratados com benznidazol (Luque et al., 2000; Ramírez-Macías et al., 2012).

### **3.5 Determinação *in vitro* das associações entre nitazoxanida e sertralina**

Nitazoxanida foi associada *in vitro* com o fármaco sertralina e a natureza das associações avaliada em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

utilizando-se o método de isoblograma modificado (Fivelman et al., 2004, Reimão e Tempone, 2011; Mesquita et al., 2013).

Para cada associação, os valores isolados de  $CE_{50}$  de cada um dos fármacos foram previamente determinados por fluorescência de forma semelhante ao método descrito no item 3.4.1, porém realizado em placa preta e com  $3 \times 10^5$  tripomastigotas/poço. Para a associação de fármacos foi realizado o procedimento utilizando-se os dois fármacos em concentrações pré-determinadas, assegurando assim, o ponto de partida da diluição seriada de base dois.

Os dois fármacos foram dissolvidos em solvente (DMSO) e diluídos em meio RPMI-1640. As concentrações foram preparadas nas seguintes proporções de nitazoxanida e sertralina 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, em placas de 96 poços, com suas duplicatas.

A concentração inicial dos fármacos usados foi: 3  $\mu$ M para nitazoxanida (NTZ) e 3  $\mu$ M para sertralina, com a finalidade de seu  $CE_{50}$  ficar próximo ao quarto poço da diluição. Também foram usados dois poços no final de cada placa como controle positivo (100% infecção).

A partir da  $CE_{50}$  de cada associação, foram realizados os seguintes cálculos:

- **Concentração Inibitória Fracionária (CIF)** =  $CE_{50}$  do fármaco combinado /  $CE_{50}$  do fármaco individual;
- **Somatória da Concentração Inibitória Fracionária ( $\Sigma$ CIF)** = CIF do fármaco A + CIF do fármaco B;
- **Média da Somatória da Concentração Inibitória Fracionária ( $X\Sigma$ CIF)** = somatória das  $\Sigma$ CIF / 4.

A  $X\Sigma$ CIF foi utilizada para classificar as associações dos fármacos avaliados. Quando a  $X\Sigma$ CIF for menor ou igual a 0,5 a associação foi considerada *sinérgica*, quando for maior que 0,5 e menor ou igual a 4, a associação foi considerada *indiferente* e quando for maior que 4, a associação foi considerada *antagônica* (Odds, 2003).

### 3.6 Estudo *in vivo*

A fim de se determinar o dia inicial do tratamento dos animais, previamente foi padronizada uma curva parasitária para determinação do pico de parasitemia. Três camundongos Swiss foram infectados intraperitonealmente com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas/animal. Do 4º ao 14º dia de infecção foi verificada a parasitemia dos animais coletando-se 5 µL sangue pela veia caudal. Destas amostras foram realizadas a contagem do número de parasitas segundo Brener, 1962 e outra alíquota foi coletada para extração de DNA por kit específico (Pure Link Genomic DNA Qiagen), a fim de se determinar a curva parasitária por PCR em tempo real.

Estabelecido o pico parasitêmico foi iniciado o tratamento *in vivo*. Utilizaram-se camundongos Swiss machos e jovens previamente infectados por via intraperitoneal com formas tripomastigotas de *T. cruzi* ( $1 \times 10^5$  parasitas/animal). Cinco dias após a infecção os animais foram tratados por via intraperitoneal durante cinco dias consecutivos com 50 mg/Kg de nitazoxanida (n=5/grupo), 40 mg/kg de sertralina (n=5/grupo) e como fármaco padrão foi utilizado o benznidazol com 50mg/kg (n=5/grupo). O grupo controle (n=5/grupo) recebeu somente o veículo composto por (10% etanol, 15% Cremophor ® EL e 75% de PBS). Os fármacos foram diluídos nessas mesmas proporções.

O tratamento foi iniciado após a verificação da parasitemia em todos os grupos tratados e no grupo controle por meio da coleta de 5 µL de sangue da cauda de cada indivíduo para a verificação da presença de parasitas no microscópio de luz (Brener, 1962). A mortalidade foi registrada diariamente após o tratamento durante 15 dias. Os experimentos foram realizados duas vezes para confirmação dos resultados.

### **3.7 Extração de DNA de tripomastigotas da cepa Y para confecção de curva padrão**

Para a determinação dos níveis de parasitemia, foi necessária a construção de uma curva padrão de DNA, sendo utilizados tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e acertados à concentração de  $1 \times 10^7$  parasitas/mL. Os mesmos foram diluídos seriadamente para se obter os pontos da curva padrão, variando a concentração de  $1 \times 10^7$  a 10 parasitas (Mesquita et al., 2010; Reimão et al., 2012). As diversas concentrações foram centrifugadas e os sedimentos dissolvidos em uma solução contendo 10 mM tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,01% N-laurilsarcozil; 100 ug/mL de proteinase K. Foram misturados e incubados a 56°C até a completa lise. O DNA foi extraído usando o Pure Link Genomic DNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os pontos da curva foram testados em triplicata.

### **3.8 Avaliação da parasitemia pela PCR em tempo real**

As amostras de DNA do sangue colhido pela veia caudal foram extraídas por um kit específico (Pure Link Genomic DNA Qiagen) dos camundongos infectados com *T. cruzi*. As reações foram realizadas em um termociclador *Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems®)*. Cada *mix* de reação continha 10 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 1 µL do marcador com sua respectiva sonda (18 µM de cada *iniciador*, 5 µM da sonda *TaqMan FAM dye-labeled* e 5 µM de *quencher NFQ*), 3 µL do DNA extraído/purificado (com intervalo de concentração em torno de 100 ng/µL), e 6 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada para completar volume final de 20 µL.

Os iniciadores foram selecionados segundo Qvarnstrom e colaboradores (2012). Neste trabalho, foram utilizados diferentes iniciadores de *T. cruzi*, sendo escolhido para o nosso estudo o da região do kDNA em

função de sua maior sensibilidade: Forward: 5' TTT GGG AGG GGC GTT CA 3'; Reverse: 5' ATA TTA CAC CAA CCC CAA TCG TCG AA 3'; TaqMan Probe: 5' CA TCTC AC CCG TACA TT 3'.

Para cada reação foram adicionados um controle positivo, a partir de DNA extraído de tripomastigotas de cultura (concentração de  $1 \times 10^7$  parasitas/mL) e um controle negativo com água ultrapura.

Primeiramente, incubou-se a reação a uma temperatura de 50° C por 2 minutos (a fim de otimizar a atividade da enzima *AmpErase<sup>®</sup>Uracil N-glycosylase* (UNG), que permitiu a remoção de qualquer produto anteriormente amplificado, minimizando a contaminação cruzada), seguido por 95° C por 10 minutos. Em seguida realizou-se 40 ciclos compostos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto.

O sistema *Step One* verifica o sinal fluorescente a cada segundo e calcula automaticamente o *mean baseline* (ou *baseline fluorescence*), ou seja, o “sinal de fundo” da fluorescência gerado durante os ciclos iniciais (3-15) da qPCR. Com base nesta “fluorescência de fundo” pode-se detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado, denominado Ct (*threshold cycle*), com acurácia. O Ct é definido como o ciclo em que a fluorescência excede estatisticamente o *mean baseline*, sendo proporcional ao número de DNA alvos presentes na amostra e representando a mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

As reações de qPCR foram previamente padronizadas utilizando DNA de tripomastigotas extraídos de cultura de células diluídas seriadamente a fim de se construir uma curva padrão.

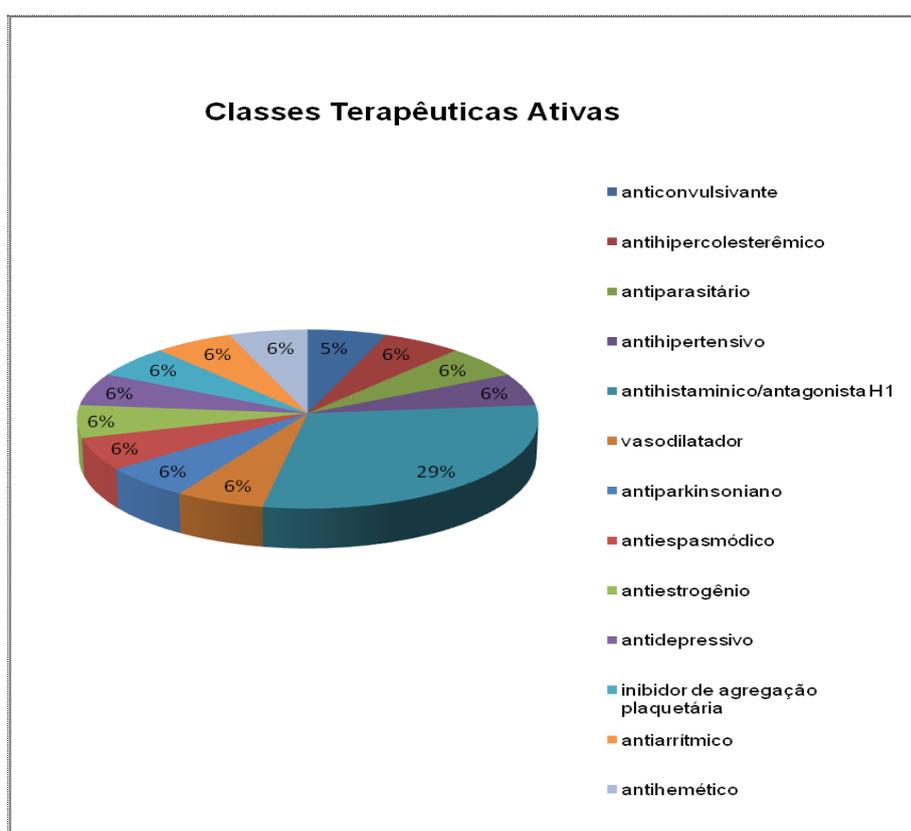
### 3.9 Análise estatística

As  $CE_{50}$  dos fármacos analisados foram determinadas por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (R). As diferenças entre amostras foram estatisticamente avaliadas por meio dos valores de P (ANOVA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Triagem da biblioteca de fármacos

A quimioteca de fármacos foi incubada por 24 horas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e a viabilidade celular avaliada pelo método colorimétrico usando Alamar Blue. Dentre as 23 classes terapêuticas estudadas, 56% (13 classes) apresentaram atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Dentre os fármacos que apresentaram atividade anti-*T. cruzi*, 6 apresentaram valores de Concentração Efetiva 50% menores que 10  $\mu\text{M}$ , sendo classificados em: antiarrítmico, antihipertensivo, antagonista de receptor H1 de histamina, antiparasitário, antiestrogênio e antidepressivo (**Fig. 13**).



**Figura 13:** Classes terapêuticas dos fármacos que apresentaram atividade anti-*T. cruzi* contra formas tripomastigotas

## 4.2 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* e citotoxicidade *in vitro* dos fármacos estudados.

Dentre os 54 fármacos testados, 17 apresentaram atividade com concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) menor que 100 µM contra as formas tripomastigotas. Considerando apenas aqueles que mataram 100% dos parasitas na concentração máxima testada, destacam-se 13 fármacos; dentre aqueles ativos, porém que mataram menos de 100% dos parasitas, destacam-se 4 fármacos, sendo estes: cinarizina, memantina, cetotifeno e clorfeniramina. O valor de CE<sub>50</sub> variou entre 1,8 a 81 µM, sendo a sertralina o fármaco mais efetivo e o cloxazolam o menos efetivo (**Tabela 3**).

A citotoxicidade foi determinada em células NCTC para os fármacos que apresentaram valores de CE<sub>50</sub> abaixo de 100 µM; após 48 horas de incubação a viabilidade foi determinada pelo método colorimétrico do Alamar Blue. Os fármacos apresentaram diferentes valores de citotoxicidade (**Tabela 3**), sendo a sertralina o fármaco que apresentou o menor valor de Concentração Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) 11,55 µM e os fármacos atorvastatina, cloxazolam, meclisina e ticlopidina apresentaram CC<sub>50</sub> maior que 200 µM.

Avaliando-se a relação entre atividade antiparasitária contra as formas tripomastigotas e a toxicidade contra células NCTC, observou-se o Índice de Seletividade que variou entre 1,2 para mesilato de diidroergocristina e 17 para cetotifeno (**Tabela 3**). O fármaco padrão, benznidazol, também foi incluído em todos os ensaios.

Considerando os seguintes critérios: i) fármacos com Índice de Seletividade maior que 5, ii) atividade inédita contra tripomastigotas e/ou amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi*, iii) CE<sub>50</sub> menor ou igual a 15 µM em tripomastigotas, iv) ter matado 100% dos tripomastigotas na concentração máxima de 200 µM, foram selecionados 6 fármacos para serem testados contra as formas intracelulares (amastigotas), sendo estes: meclisina, nitazoxanida, raloxifeno, saquinavir, sertralina, e clorfeniramina. Dos 6 fármacos testados, 5 apresentaram atividade contra as formas amastigotas, sendo a sertralina o fármaco mais ativo com valor de CE<sub>50</sub> de

1,46  $\mu\text{M}$  e saquinavir o menos ativo com valor de  $\text{CE}_{50}$  de 32,48  $\mu\text{M}$  (**Tabela 3**). O segundo fármaco mais ativo contra os amastigotas foi a nitazoxanida, com  $\text{CE}_{50}$  de 4,5  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 3:** Valores expressos em  $\mu\text{M}$  das  $\text{CE}_{50}$  dos fármacos estudados contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e citotoxicidade em células de mamífero NCTC e IS dos fármacos.

	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Citotoxicidade	Índice de Seletividade
Fármacos	tripomastigotas	amastigotas	NCTC	
	$\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (C.I.95%)	$\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (C.I.95%)	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (C.I.95%)	
acetazolamida	>200	–	–	–
ácido acetilsalicílico	>200	–	–	–
ácido salicílico	>200	–	–	–
aminofilina	>200	–	–	–
amiodarona	3,13 (2,83 – 3,46)	–	37,61 (31,08 – 45,51)	12,0
atorvastatina	60,14 (55,33 – 65,36)	–	>200	>3,3
benzopirona	>200	–	–	–
carbamazepina	>200	–	–	–
carvedilol	7,51 (6,86 – 8,22)	–	31,83 (27,17 – 37,30)	4,2
cetirizina	>200	–	–	–
cetoprofeno	>200	–	–	–
cetorolaco de trometamina	>200	–	–	–
cetotifeno	5,05 (0,73 – 34,58)	–	86,88 (60,97 – 123,8)	17,2
clorfeniramina	15,0 (9,27 – 24,37)	–	87,39 (65,37 – 116,8)	5,8
cilostazol	>200	–	–	–
cinarizina	11,23 (3,95 – 31,94)	–	87,48 (65,65 – 116,6)	7,7
ciprofibrato	>200	–	–	–

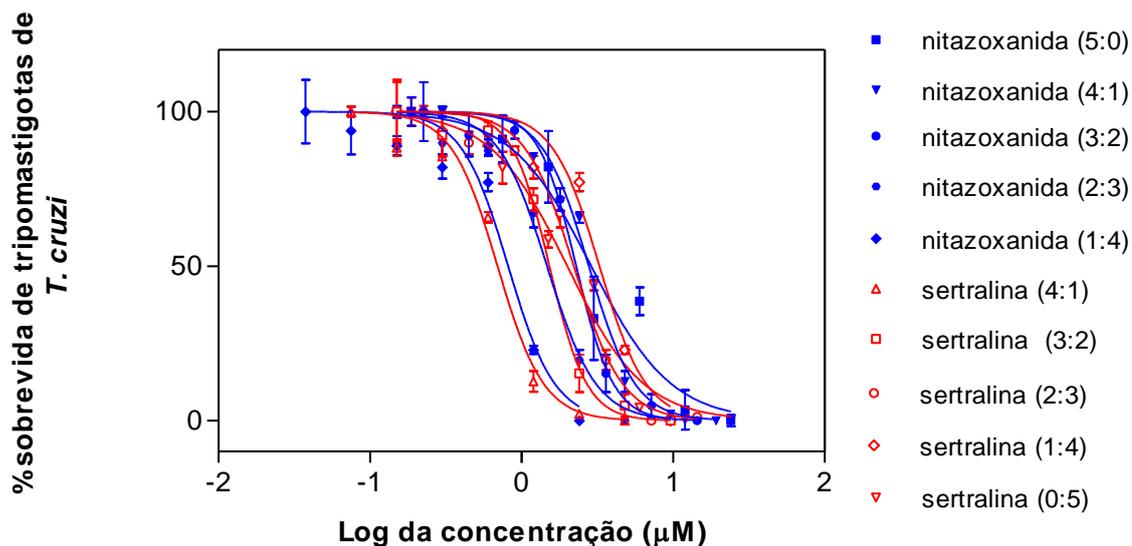
<b>ciprofloxacino</b>	>200	–	–	–
<b>ciproheptadina</b>	34,32 (30,13 – 39,02)	–	78,67 (47,98 – 129,0)	2,3
<b>cloxazolam</b>	81,63 (76,27 – 87,37)	–	>200	3,3
<b>diclofenaco de sódio</b>	>200	–	–	–
<b>dipirona sódica</b>	>200	–	–	–
<b>fexofenadina</b>	>200	–	–	–
<b>finasterida</b>	>200	–	–	–
<b>fluranizina</b>	>200	–	–	–
<b>furosemida</b>	>200	–	–	–
<b>gemfibrozila</b>	>200	–	–	–
<b>hesperidina</b>	>200	–	–	–
<b>ibuprofeno</b>	>200	–	–	–
<b>lamivudina</b>	>200	–	–	–
<b>losartana</b>	>200	–	–	–
<b>meclisina</b>	14,43 (11,65 – 17,88)	8,89 (7,88 – 10,03)	>200	>13,8 >22,5*
<b>mesilato de diidroergocristina</b>	21,42 (20,16 – 22,76)	–	26,7 (8,77 – 81,44)	1,2
<b>memantina</b>	37,15 (11,75 – 117,4)	–	86,51 (75,11 – 99,63)	2,3
<b>metronidazol</b>	>200	–	–	–
<b>naproxeno</b>	>200	–	–	–
<b>nitazoxanida</b>	2,58** (2,33 – 2,84)	4,5 (3,55 – 5,69)	42,61** (39,22 – 46,30)	16,5*** 9,4*
<b>oxibutinina</b>	37,19 (36,45 – 37,96)	–	76,80 (36,94 – 159,7)	2,0
<b>pantoprazol</b>	>200	–	–	–
<b>paracetamol</b>	>200	–	–	–
<b>pirazinamida</b>	>200	–	–	–
<b>piroxicam</b>	>200	–	–	–
<b>praziquantel</b>	>200	–	–	–
<b>prednisona</b>	>200	–	–	–
<b>raloxifeno</b>	4,21 (3,74 – 4,74)	8,88 (6,81 – 11,59)	24,67 (22,15 – 27,47)	5,8 2,7*
<b>risperidona</b>	>200	–	–	–

ritonavir	>200	–	–	–
saquinavir	11,83 (10,55 – 13,27)	32,48 (22,83 – 46,20)	148,0 (98,43 – 222,5)	12,5 4,5*
secnidazol	>200	–	–	–
sertralina	1,82 (1,46 – 2,28) 2,98** (2,71 – 3,29)	1,46 (1,15 – 1,84)	11,55 (10,90 – 12,23) 26,44** (24,82 – 28,17)	6,3 7,9* 8,8***
teofilina	>200	–	–	–
ticlopidina	64,31 (55,07 – 75,10)	–	>200	>3,1
tinidazol	>200	–	–	–
zidovudina	>200	–	–	–
benznidazol <sup>a</sup>	440,73 (406,15 – 478,39)	230,3 (176,2 – 301,1)	469,93 (414,98 – 532,18)	1,0 2,0*

\*IS em formas amastigotas, \*\* CE<sub>50</sub> em fluorescência, \*\*\* IS em fluorescência, <sup>a</sup>fármaco padrão.

### 4.3 Associação entre nitazoxanida e sertralina

Com o objetivo de se buscar associações terapêuticas entre fármacos ativos no *T. cruzi*, foi estudada a associação *in vitro* entre a nitazoxanida e sertralina através do método de isoblograma de proporções fixas modificado, utilizando-se tripomastigotas de *T. cruzi*. Ao final de cada experimento de associação, foram geradas quatro curvas dose-resposta, correspondente às diferentes proporções em que os fármacos foram combinados (4:1, 3:2, 2:3, e 1:4) e duas curvas correspondentes aos fármacos isolados (5:0 e 0:5), totalizando seis curvas do tipo *dose-resposta*. As curvas obtidas pela associação de nitazoxanida e sertralina são apresentadas na **figura 14**. Conforme pode ser observado para a nitazoxanida associada a sertralina, houve um deslocamento constante das curvas sigmoidais dose-resposta da direita para a esquerda.



**Figura 14:** Curvas de dose-resposta geradas pela associação de nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de *T. cruzi*.

O fármaco nitazoxanida isoladamente apresentou valor de  $CE_{50}$  de  $2,88 \mu\text{M}$  (**tabela 4**) enquanto que a sertralina apresentou valor de  $CE_{50}$  de  $2,01 \mu\text{M}$ . Ao se calcular a somatória da Concentração Inibitória Fracionária ( $\Sigma\text{CIF}$ ) de cada associação, foram obtidos valores que variaram de 1,30 a 1,91.

Com base nos valores de  $CE_{50}$  de cada associação e as respectivas CIF de ambos os fármacos, foi calculada a média da somatória das concentrações inibitórias fracionárias ( $X\Sigma\text{CIF}$ ), as quais são apresentadas na **tabela 4**. Por sua vez, a média da  $\Sigma\text{CIF}$ , a qual representa o comportamento geral da associação foi de 1,59 (**tabela 5**), indicando uma interação indiferente de acordo com a classificação adotada no presente trabalho.

**Tabela 4:** Valores de  $CE_{50}$  e CIFs da associação entre os fármacos nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de *T. cruzi*.

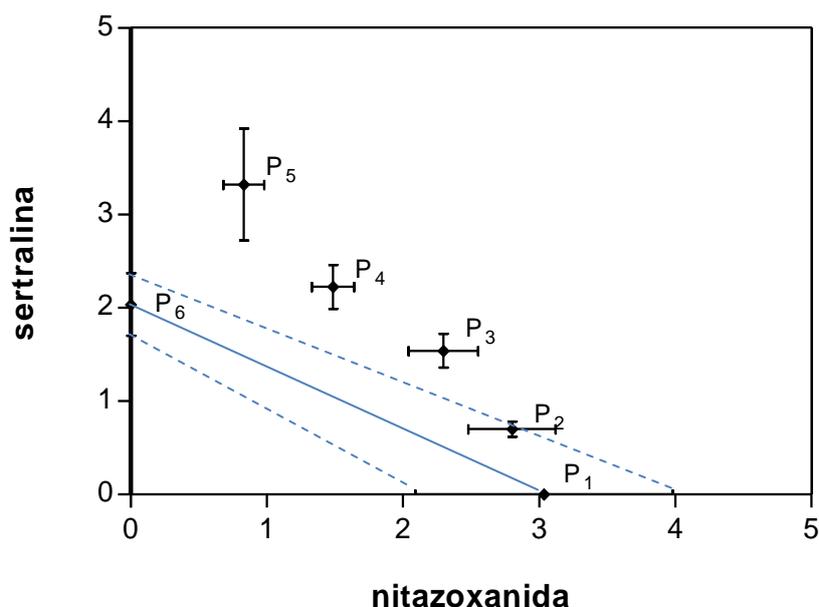
Associação	$CE_{50}$ da associação ( $\mu M$ )		CIF da associação ( $\mu M$ )		$\Sigma$ CIF
	(IC 95%)		(IC 95%)		
	nitazoxanida	sertralina	nitazoxanida	sertralina	
5:0	2,88 (2,09 – 3,98)	-	-	-	-
4:1	2,78 (2,48 – 3,12)	0,69 (0,62 - 0,78)	0,96	0,34	1,30
3:2	2,30 (2,04 - 2,58)	1,53 (1,36 - 1,72)	0,80	0,76	1,56
2:3	1,48 (1,33 - 1,64)	2,21 (1,99 - 2,46)	0,51	1,10	1,61
1:4	0,82 (0,68 - 0,98)	3,27 (2,72 – 3,92)	0,28	1,63	1,91
0:5	-	2,01 (1,70 - 2,37)	-	-	-

**Tabela 5:** Valores da  $X\Sigma$ CIF associação entre os fármacos nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de *T. cruzi*.

Associação	$X\Sigma$ CIF
nitazoxanida + sertralina	1,59

$X\Sigma$ CIF: média da somatória das concentrações inibitórias fracionárias.

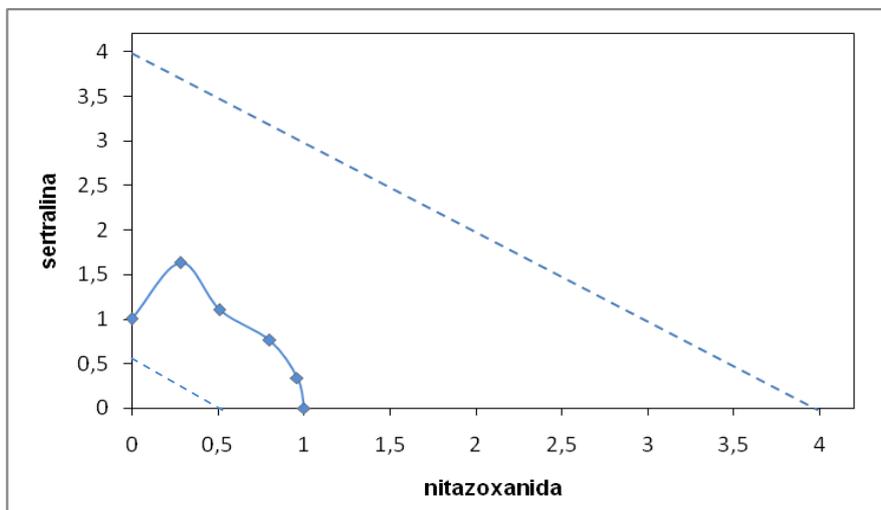
Os isobologramas obtidos no presente trabalho são apresentados nas **figuras 15 e 16**, com base nos valores de  $CE_{50}$  e de CIF, respectivamente. Na **figura 15**, os valores de  $CE_{50}$  das associações foram incorporados e o intervalo de confiança 95% (IC 95%) foi representado por uma barra de erros ao redor de cada ponto. Com base no IC95% dos fármacos aplicados isoladamente, gerou-se uma faixa de intervalo de confiança, que foi identificada por duas linhas pontilhadas. A linha de aditividade, por sua vez, foi indicada por uma linha contínua, que foi gerada pela junção dos valores de  $CE_{50}$  dos fármacos aplicados isoladamente. Nesta figura pode ser observado a presença dos pontos acima da linha de aditividade na associação entre nitazoxanida e sertralina.



**Figura 15:** Isoblograma gerado com base nos valores de  $CE_{50}$  da associação de nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de *T. cruzi*. Os pontos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> e P<sub>6</sub> correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de nitazoxanida e sertralina, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade, as linhas pontilhadas indicam a faixa de confiança e as barras ao redor dos pontos correspondem aos intervalos de confiança.

A análise dos pontos isolados em relação à linha de aditividade considera que os valores abaixo da linha de aditividade são sinérgicos e os valores acima são antagônicos. Desta forma, os valores de CIF abaixo de 1 são considerados sinérgicos, acima de 1 são antagônicos e iguais a 1 são indiferentes ou aditivos. Apesar de alguns autores utilizarem esta classificação, uma mais conservadora foi proposta por Odds (2003), onde os valores de CIF abaixo de 0,5 são considerados sinérgicos e os valores acima de 4 são considerados antagônicos, enquanto que os valores no intervalo de 0,5 a 4 são considerados indiferentes ou aditivos. Baseado nesta classificação, a associação entre nitazoxanida e sertralina apresentaram interação *indiferente*, como pode ser observado na **figura 16**. Nesta figura, os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado por linhas pontilhadas. Desta forma, fica claro que, todos

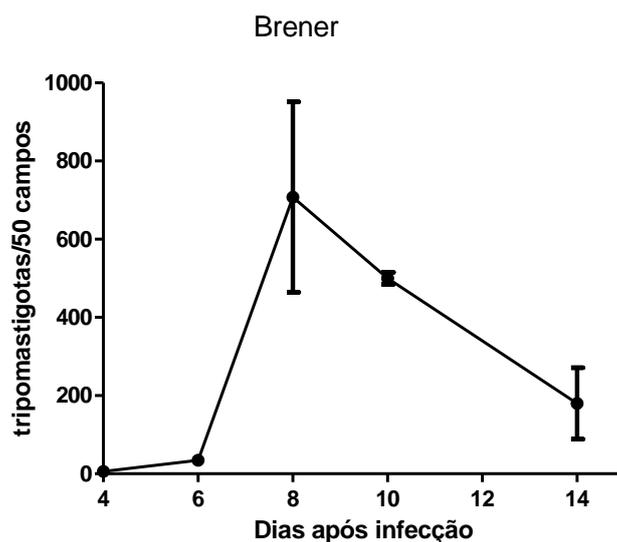
os pontos se encontram dentro da faixa que classifica estes valores como *indiferentes* (**figura 16**).



**Figura 16:** Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação de nitazoxanida e sertralina em tripomastigotas de *T. cruzi*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas.

#### 4.4 Estabelecimento da curva de parasitemia em modelo experimental

Com o objetivo de se avaliar a efetividade dos fármacos previamente selecionados no ensaio *in vitro*, realizou-se a princípio um estudo em modelo experimental em camundongos Swiss com a cepa Y de *T. cruzi*. A contagem do número de parasitas presentes no sangue (parasitemia) foi realizada pelo método de Brener por um período máximo de 14 dias pós-infecção, realizando as contagens em intervalos de 2 dias. Conforme a **figura 17**, observou-se aumento da parasitemia a partir do dia 4 pós-infecção, com aumento gradativo até o dia 6, ocorrendo um pico máximo no dia 8 pós-infecção, com cerca de 707 tripomastigotas/50 campos. Após este período, observou-se um decréscimo contínuo da parasitemia até o 14<sup>o</sup> dia pós-infecção, com aproximadamente 180 tripomastigotas/50 campos.

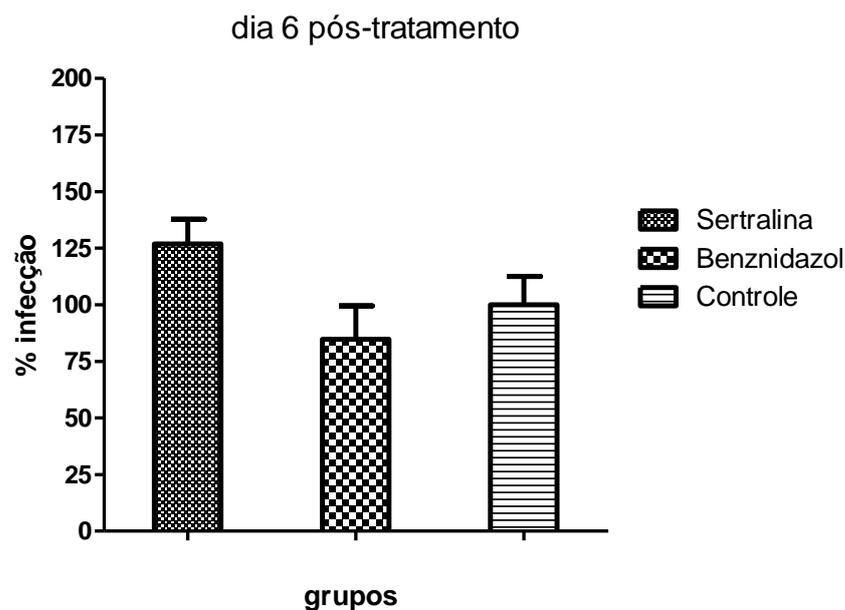


**Figura 17:** Avaliação da parasitemia de camundongos Swiss infectados previamente com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas/animal de *T. cruzi* (cepa Y) por microscopia óptica segundo Brener.

Após a determinação do pico de parasitemia, optou-se por iniciar o tratamento com os fármacos candidatos no 5<sup>o</sup> dia pós-infecção (d.p.i) e finalizá-lo no 10<sup>o</sup> (d.p.i).

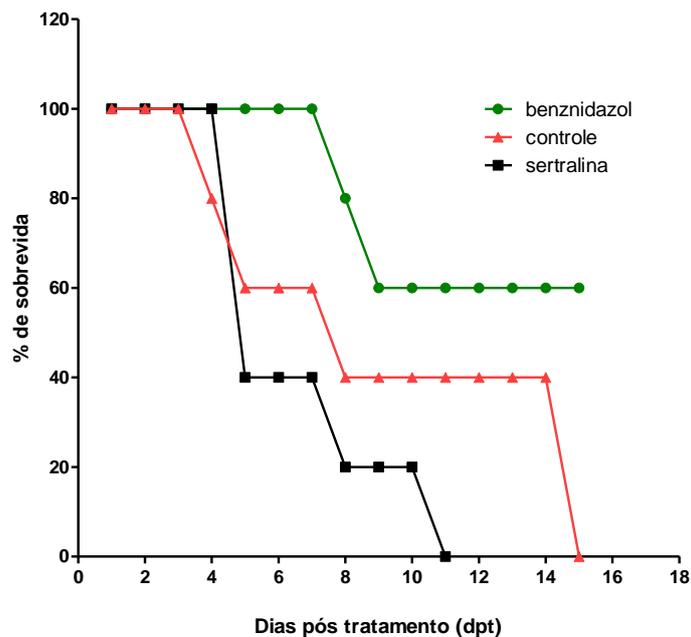
#### 4.5 Estudo da efetividade da sertralina e da nitazoxanida em modelo experimental

**Estudo da sertralina:** Após infecção dos animais (**item 3.5**), iniciou-se a avaliação *in vivo* da sertralina, a qual foi administrada na dose de 40 mg/kg/dia pela via intraperitoneal. Com o objetivo de confirmar a infecção nos animais antes do início do tratamento, foi observado por microscopia óptica que 100% dos animais apresentavam parasitemia. Os resultados demonstraram que ao final do tratamento não se observou diferença estatística ( $p > 0.05$ ) entre o grupo tratado com a sertralina e o grupo não tratado (controle). Ainda assim, um aumento de 26% ( $p > 0.05$ ) na parasitemia foi observado no grupo tratado em relação ao grupo controle. O fármaco benznidazol foi utilizado como controle e reduziu a parasitemia em aproximadamente 15% quando comparado ao grupo controle (**Fig. 18**).



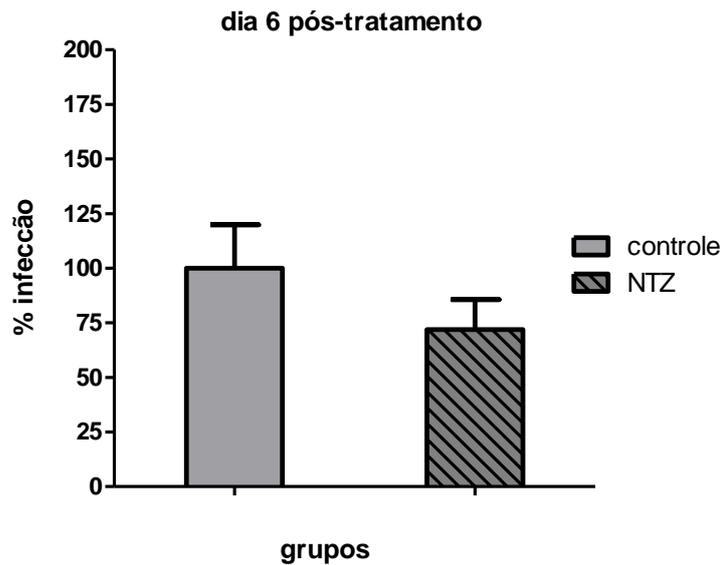
**Figura 18:** Avaliação do tratamento *in vivo* de camundongos infectados com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados com o fármaco sertralina na dose de 40 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos (i.p.). O fármaco benznidazol foi utilizado como controle do ensaio e administrado na dose de 50 mg/kg/dia (i.p.). A parasitemia dos grupos tratados e controle foi determinada pelo método de Brener. \* ( $p < 0.05$ )

**Curva de Mortalidade Pós-Tratamento:** A mortalidade dos animais tratados com sertralina, assim como o grupo não tratado (controle) foi acompanhada por até 15 dias pós-tratamento. No grupo tratado com sertralina observou-se 3 óbitos (3 dos 5 animais) em apenas 5 dias pós-tratamento (d.p.t.). Neste mesmo período, 2 animais (2 de 5 animais) do grupo controle vieram a óbito. Após 11 d.p.t., 100% dos animais tratados com sertralina evoluíram a óbito, sendo que no grupo tratado com benznidazol, apenas 2 animais (2 de 5) haviam morrido neste mesmo período (**Fig.19**).



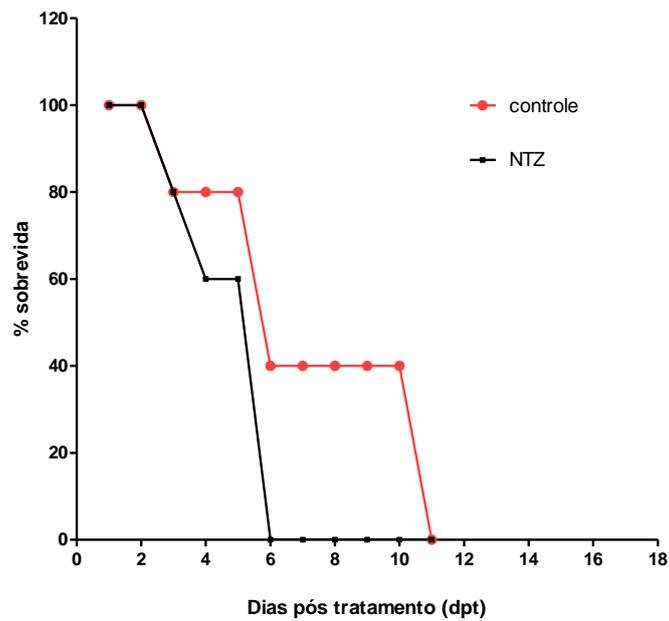
**Figura 19:** Avaliação da mortalidade referente ao tratamento *in vivo* de camundongos infectados com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados com o fármaco sertralina na dose de 40 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos (i.p.). O fármaco benznidazol foi utilizado como controle do ensaio e administrado na dose de 50 mg/kg/dia (i.p.).

**Estudo da nitazoxanida:** Após infecção dos animais, iniciou-se a avaliação *in vivo* da nitazoxanida, a qual foi administrada na dose de 50 mg/kg/dia pela via intraperitoneal. Com o objetivo de se confirmar a infecção nos animais antes do início do tratamento, foi observado por microscopia óptica que 100% dos animais apresentavam parasitemia. Os resultados demonstraram que ao final do tratamento, o fármaco nitazoxanida reduziu a parasitemia em 29% ( $p > 0.05$ ) quando comparado ao grupo não tratado (controle) (**Fig. 20**). O controle utilizando o fármaco padrão benznidazol pode ser observado na **figura 18**.



**Figura 20:** Avaliação do tratamento *in vivo* de camundongos infectados com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados com o fármaco nitazoxanida na dose de 50 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos (i.p.). A parasitemia dos grupos tratados e controle foi determinada pelo método de Brener. \* ( $p < 0.05$ )

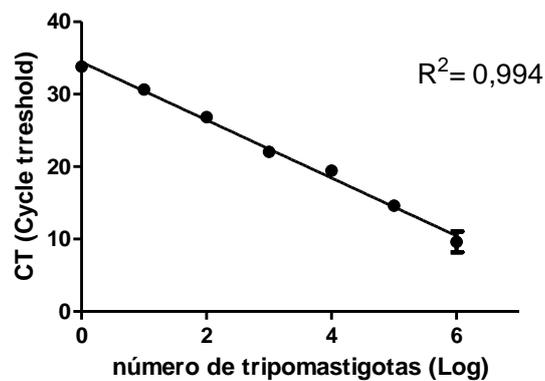
**Curva de Mortalidade Pós-Tratamento:** A mortalidade dos animais tratados com nitazoxanida, assim como o grupo não tratado (controle) foi acompanhada por até 15 dias pós-tratamento. No grupo tratado com nitazoxanida, assim como no grupo controle, observou-se uma redução em 20% da sobrevivência (1 óbito entre 5 animais) em 3 dias pós-tratamento (d.p.t.). No quarto dia pós-tratamento, a sobrevivência do grupo tratado com nitazoxanida reduziu para 60%, sendo que no sexto dia pós-tratamento a mortalidade foi de 100% neste grupo. O grupo não tratado (controle) manteve uma sobrevivência de 40% até o décimo dia pós-tratamento, porém 100% dos animais evoluíram a óbito no 11º d.p.t. (**Fig. 21**).



**Figura 21:** Avaliação da mortalidade dos grupos de camundongos Swiss infectados pela via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados com nitazoxanida. O grupo controle utilizou apenas o veículo como controle interno.

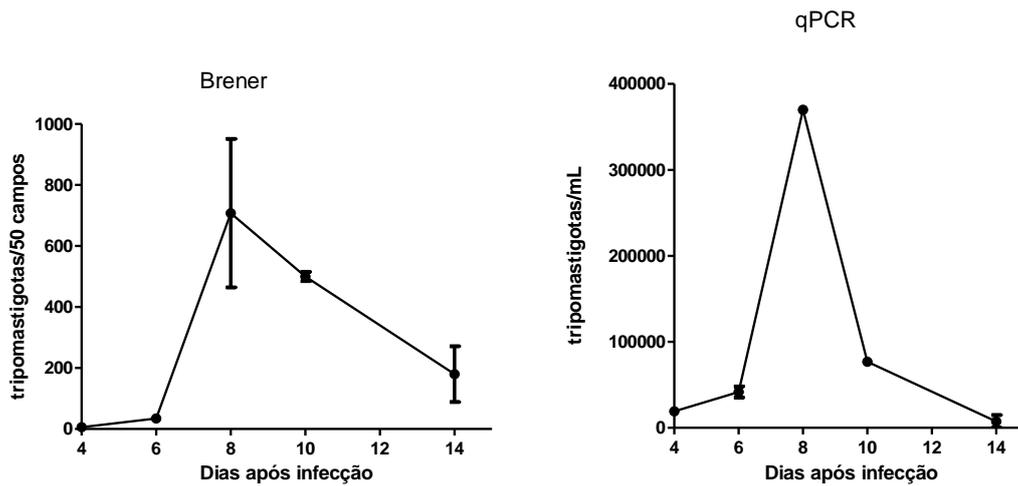
#### 4.6 Avaliação da parasitemia pela PCR em tempo real (pPCR)

Com o objetivo de se avaliar a parasitemia da cepa Y pela técnica de PCR em tempo real e compará-la ao método de contagem em microscopia óptica de Brener, foi realizada uma curva a partir do DNA extraído de formas tripomastigotas de cultura celular de LLC-MK2 (**Fig. 22**). A curva apresentou um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,994$ .



**Figura 22:** Curva padrão obtida do log das diluições seriadas de DNA de *T. cruzi* e seus respectivos valores de CT.

Após a padronização da curva com formas tripomastigotas de cultura celular pela qPCR, acompanhou-se a parasitemia dos animais infectados tanto pelo método de Brener (**Fig. 23A**), como pela qPCR (**Fig. 23B**). Os resultados demonstraram similaridade no perfil de parasitemia por ambas as técnicas, confirmando a ascensão da parasitemia a partir do dia 4 pós-infecção e um pico máximo no dia 8 pós-infecção, com decréscimo da parasitemia até o 14<sup>o</sup> dia pós-infecção.



**Figura 23:** Avaliação da parasitemia de camundongos infectados com  $1 \times 10^5$  tripomastigotas de *T. cruzi* pelo método de Brener (A) e pela qPCR (B).

## 5 DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma doença tropical parasitária, incluída pela Organização Mundial de Saúde na lista das principais doenças negligenciadas. No Brasil, apenas o fármaco nitroimidazólico, denominado benznidazol, está disponível para o tratamento clínico; sua efetividade ainda é bastante controversa, principalmente no tratamento de pacientes durante a fase crônica da doença (Ianni e Mady, 1998). Apesar de sua eficácia no tratamento da fase aguda, o medicamento apresenta vários efeitos adversos, incluindo reações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (Coura et al., 2002; Dias et al., 2009). Nesse contexto, a busca por uma terapia medicamentosa adequada ao tratamento da doença de Chagas continua a ser um desafio.

A pesquisa em novos fármacos vem apontando a classe dos antifúngicos azóis como candidatos promissores. Dentre estes, um pró-fármaco desenvolvido com apoio do DNDi, denominado de E1224, que no organismo é metabolizado ao antifúngico ravuconazol, vem sendo estudado em fase clínica II na Bolívia (DNDi, 2014). Sendo assim, observa-se que a estratégia de *reposicionamento de fármacos*, assim como, *associações terapêuticas*, vêm sendo amplamente abordadas na doença de Chagas. Apesar de não muito promissores, estudos clínicos foram realizados com o alopurinol (Rassi et al., 2007), itraconazol (Apt et al., 2005), bem como a associação de benznidazol, itraconazol e fluconazol (Solari et al., 1993). Outras associações terapêuticas também foram realizadas com nifurtimox e benznidazol, nifurtimox associado ao alopurinol, assim como nifurtimox associado ao cetoconazol (Coura, 2009; Cencig et al., 2012).

No presente trabalho, utilizando a estratégia de *reposicionamento de fármacos*, observamos a atividade de dezessete fármacos contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, demonstrando em alguns casos, uma maior eficácia quando comparados ao fármaco padrão, benznidazol. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* são amplamente encontradas na circulação sanguínea (parasitemia elevada) durante a fase aguda da doença,

principalmente nas duas primeiras semanas pós-infecção, onde a produção de anticorpos IgM e IgG ainda é reduzida (Rassi et al., 2012). Fármacos que atuem nesta forma do parasita poderiam ser utilizados tanto na fase aguda da doença, como para bloquear o seu ciclo de vida no interior das células de mamífero.

Em nosso estudo, dentre os fármacos ativos, observou-se que estes pertenciam a treze classes terapêuticas diferentes, destacando-se os antiarrítmicos, antihipertensivos, antagonistas de receptor de H1, antiparasitários, antiestrogênio e antidepressivos como os mais ativos. Ainda assim, os antagonistas de receptor H1 de histamina perfizeram 29% do total de fármacos ativos estudados.

Dentre os fármacos antihipertensivos mais ativos em nosso estudo contra os tripomastigotas, destaca-se o carvedilol, que se apresentou cerca de 58 vezes mais efetivo *in vitro* do que o benznidazol. Apesar da atividade anti-*T. cruzi* ter sido descrita pela primeira vez, o potencial terapêutico deste fármaco vem sendo estudado na cardiomiopatia chagásica. Em estudo publicado por Pimentel e colaboradores (2012), o carvedilol aumentou a sobrevivência de animais infectados com *T. cruzi*, apesar de não influenciar o remodelamento cardíaco.

Em relação aos antagonistas de receptor H1 de histamina, descrevemos pela primeira vez na literatura, a atividade anti-*T. cruzi* desta classe. Dos oito fármacos testados, a ciproheptadina, clorferinamina, meclisina, cinarizina e cetotifeno apresentaram atividade contra os tripomastigotas, sendo cerca de 13 a 88 vezes mais efetivos *in vitro* do que o fármaco padrão benznidazol. Dentre estes, apenas a meclisina apresentou atividade contra as formas intracelulares do parasita, os amastigotas, demonstrando potencial para futuros estudos experimentais. Até o momento, antagonistas de H1 foram apenas estudados em associação terapêutica contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, utilizando a clorferinamina para reverter a resistência a cloroquina (Sowunmi et al., 1997). Considerando doenças bacterianas, derivados de antagonistas H1 de histamina foram

sintetizados, apresentando atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, com CE<sub>99</sub> de 6 µg/mL (Weis et al., 2008).

O fármaco raloxifeno (antiestrogênio) apresentou de forma inédita atividade contra *T. cruzi*, sendo cerca de 104 e 116 vezes mais ativo que o benznidazol contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente. Porém, apesar de sua atividade, a seletividade deste fármaco demonstrou valores baixos, não justificando seu estudo em modelos experimentais futuros. Além disso, a atividade de outro fármaco desta classe, o tamoxifeno, foi descrita contra todas as formas do parasita, com valores de CE<sub>50</sub> entre 0,7 a 17 µM, porém sem apresentar nenhuma efetividade quando testado em modelo murino (Miguel et al., 2010).

Dentre os fármacos mais ativos em nosso estudo contra os tripomastigotas, também destaca-se o antiarrítmico amiodarona, que apresentou-se cerca de 140 vezes mais efetivo que o benznidazol. Nossos estudos corroboram os dados descritos por Veiga-Santos e colaboradores (2012), onde demonstraram a atividade da amiodarona contra formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* com CE<sub>50</sub> de 8 e 5,6 µM, respectivamente. Um outro derivado da amiodarona, a dronedarona, demonstrou uma efetividade contra formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* com CE<sub>50</sub> de 4.6 µM e 0.75 µM respectivamente, (Benaim et al., 2012).

Dentre os fármacos antidepressivos/anticonvulsivantes testados, a sertralina, apresentou de forma inédita a atividade anti-*T. cruzi*, sendo cerca de 240 e 157 vezes mais efetivo do que o benznidazol contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente. Uma extensa revisão da literatura mostra que a sertralina também exibe atividade antifúngica (Lass-Florl et al., 2001), antimicrobiana (Munoz-Bellido et al., 2000), espermicida e anti-trichomonas (Kumar et al., 2006), bem como atividade anticancerígena (Tuynder et al., 2004). Além disso, um estudo realizado por Palit e Ali (2008) demonstrou que o fármaco também foi eficaz contra formas amastigotas intracelulares de *L. donovani*, com uma CE<sub>50</sub> de 2,2 µM.

Dentre os antiparasitários testados, verificamos a atividade anti-*T. cruzi* para o nitro-composto nitazoxanida (NTZ), o qual apresentou uma efetividade 170 vezes maior do que o fármaco padrão benznidazol e aproximadamente 51 vezes mais efetivo quando testado contra os amastigotas intracelulares. A nitazoxanida é um derivado nitrotiazólico indicado para o tratamento de diarreias causadas pelos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*, além de ter sido reposicionado para o tratamento do rotavírus (Rossignol et al., 2006). Chan-Baccab e colaboradores (2009) demonstraram a atividade da NTZ contra formas epimastigotas presentes no intestino do inseto vetor (cepa MHOM/MX/94/Ninoa), com uma CE<sub>50</sub> de 5 µM. Posteriormente, Navarrete-Vazquez e colaboradores (2011) observaram o mesmo efeito em formas epimastigotas com uma CE<sub>50</sub> de 18,73 µM. Novos derivados sintéticos também têm sido explorados, demonstrando que a nitazoxanida pode ser um interessante protótipo para o desenho e síntese de compostos mais seletivos para diversos protozoários (Navarrete-Vazquez et al., 2011). Nosso estudo demonstra pela primeira vez na literatura a atividade da NTZ contra formas infectantes tripomastigotas, assim como os amastigotas intracelulares da cepa Y. Outros nitrocompostos vem sendo estudados em fase clínica para protozooses, como o fexnidazol, para a doença do sono (tripanossomíase africana–HAT fase clínica II) e para a leishmaniose visceral (fase clínica II/III) (DNDi, 2014). Apesar dos fármacos metronidazol, secnidazol e tinidazol apresentarem o anél nitroimidazólico, presente também em compostos que vêm sendo utilizados como protótipos líderes para estudos de otimização pelo DNDi na doença de Chagas, estes fármacos não resultaram em morte das formas tripomastigotas em nosso estudo. Um estudo experimental corrobora o potencial deste fármaco em modelo murino, onde se observou uma redução em 80% da parasitemia (cepa Y) em camundongos infectados (Bahia et al., 2012).

O objetivo na terapia da doença de Chagas é alcançar a meta ambiciosa de eliminar o parasita ou pelo menos reduzir a parasitemia (Marin-Neto et al., 2009; Sosa-Estani et al., 2009). A *associação de fármacos* pode

trazer benefícios relevantes na terapêutica de diversas doenças e apresentar muitas vantagens diante da monoterapia (Speich et al., 2012). Para entendermos melhor, quando um paciente se encontra sob a ação de um único medicamento e um segundo é adicionado, existem três possibilidades: os efeitos clínicos podem ser simplesmente a soma do efeito de cada fármaco isoladamente (*efeito aditivo* ou *indiferente*); o efeito da adição do segundo fármaco pode ultrapassar o efeito individual de cada fármaco isoladamente (*efeito sinérgico*), ou o efeito dos dois fármacos em conjunto pode ser menor do que o efeito de cada fármaco isoladamente (*efeito antagônico*) (Stafstrom, 2010). Da mesma forma, os efeitos adversos ou toxicidade da associação podem ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos. No que diz respeito à eficácia clínica, sinergia (ou, pelo menos, aditividade) é desejável, enquanto que do ponto de vista dos efeitos adversos, o antagonismo é preferível (Stafstrom, 2010). Para fins práticos, é aceitável utilizar uma combinação de fármacos que apresentem efeitos intermediários, tais como dois fármacos que são aditivos no que diz respeito ao seu efeito clínico, porém que demonstrem antagonismo de seus efeitos adversos, ou ainda, que os dois fármacos sejam sinérgicos clinicamente, mas seus efeitos adversos sejam apenas aditivos (Mesquita et al., 2013).

Levando-se em consideração que as formas amastigotas intracelulares são mais relevantes do ponto de vista clínico por se tratar da forma mais abundante encontrada no hospedeiro humano na fase crônica da doença (Rassi et al., 2012), o próximo passo foi a escolha dos dois fármacos mais ativos em macrófagos infectados, para avaliação da associação terapêutica em modelos *in vitro*. Dentre os seis compostos testados em nosso estudo, a nitazoxanida e a sertralina apresentaram os resultados mais promissores, sendo selecionados para a associação *in vitro* e estudos experimentais *in vivo*.

Nosso estudo indicou que a interação entre nitazoxanida e sertralina foi *indiferente* ou *aditiva* de acordo com a classificação proposta por Odds (2003). Segundo este autor, a experimentação em associações terapêuticas pode levar a conclusões opostas por diferentes metodologias, conforme

também relatado por Lewis e colaboradores (2002). Estudo realizado por Strauss e colaboradores (2013) mostrou que a combinação de benznidazol e clomipramina apresentou a mesma eficácia da dose atual de 100 mg/Kg/dia do fármaco padrão. Já o estudo de Araujo e colaboradores (2000) demonstrou que a associação de benznidazol e cetoconazol em diferentes dosagens apresentou-se de forma “sinérgica”, porém não foram considerados os valores propostos por Odds. Além disso, fatores farmacodinâmicos poderiam ser considerados, visto que a metabolização de fármacos no organismo gera produtos diferentes daqueles administrados inicialmente (Croft et al., 2006). Em nossos estudos, sendo a associação *in vitro* entre nitazoxanida e sertralina *indiferente*, possibilitar-nos-á evoluir para futuros testes experimentais *in vivo*, visto que nenhum antagonismo pôde ser encontrado. Considerando ainda os resultados promissores obtidos em nossa triagem de fármacos, outros compostos poderiam ser escolhidos visando a associação terapêutica *in vitro* para a seleção de combinações sinérgicas a serem testadas em modelos experimentais.

Com base nos dados obtidos da associação entre nitazoxanida e sertralina no presente trabalho, o próximo passo foi a avaliação do tratamento *in vivo* dos fármacos isoladamente. A sertralina, um dos fármacos com promissora atividade *in vitro* contra ambas as formas de *T. cruzi* testadas em nosso estudo, foi administrada pela via intraperitoneal em camundongos infectados, porém, nossos dados demonstraram que este fármaco não contribuiu na redução da parasitemia após cinco dias de administração. Utilizando-se o fármaco padrão benznidazol, observou-se também uma baixa eficácia, reduzindo em apenas 15% a parasitemia quando administrado por 5 dias. Um estudo experimental de reposicionamento da sertralina, demonstrou que o fármaco foi efetivo contra *Leishmania donovani* em modelo murino, reduzindo em aproximadamente 70% a carga parasitária do fígado e baço após tratamento oral na dose de 10 mg/kg, sendo administrada duas vezes semanalmente, compreendendo um período de 30 dias (Palit e Ali, 2008). Em nosso estudo a mortalidade dos animais tratados com sertralina foi acompanhada por até 15 dias pós-

tratamento, onde foi possível observar que após 11 dias pós-tratamento, 100% dos animais tratados com sertralina evoluíram a óbito. Por outro lado, o grupo não tratado (controle) apresentou uma sobrevida maior, com 100% de óbito dos animais no 15º dia pós-tratamento. O benznidazol, apesar de ter reduzido em apenas 15% a parasitemia, prolongou a sobrevida dos animais, resultando em 60% de sobrevida após os 15 dias de tratamento. Apesar da meia vida plasmática da sertralina ser de 25,4 horas em um indivíduo saudável, a concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) atingida pelo fármaco é de 20 ng/mL (Demólis et al., 1996). Considerando que o fármaco em nosso modelo *in vitro* apresentou uma  $CE_{50}$  de aproximadamente 2  $\mu$ M contra as as formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares, a falha terapêutica observada em nosso modelo animal poderia ser justificada pelos baixos níveis plasmáticos do fármaco após administração. Ainda, dados da literatura reportam que a sertralina, após metabolização pelo citocromo P450, resulta no metabólito desmetilsertralina, que apresenta apenas 5-10% da potência do fármaco original (Sprouse et al., 1996). Apesar de nosso estudo não ter avaliado a efetividade *in vitro* da desmetilsertralina, este metabólito poderia ainda não apresentar atividade anti-*T. cruzi*, o que justificaria a ausência de atividade em nosso modelo animal.

Com o objetivo de aumentar a disponibilidade intracelular da sertralina às células infectadas com *T. cruzi*, evitando ainda sua rápida metabolização, sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos poderiam ser propostos para este fármaco, uma vez que sua atividade *in vitro* demonstrou elevada efetividade. Sistemas de liberação controlada e sustentada de fármacos vem sendo propostos para o nifurtimox assim como para o benznidazol, possibilitando um aumento da efetividade destes fármacos (Salomon, 2012). Assim, outros modelos e esquemas terapêuticos, associados a SLCs poderiam re-avaliar o potencial da sertralina como candidato a fármaco.

Os resultados do tratamento *in vivo* da nitazoxanida pela via intraperitoneal, demonstraram que o fármaco reduziu a parasitemia em 29% ( $p > 0.05$ ) em relação ao grupo não tratado (controle), levando-se em consideração que os animais foram infectados com uma alta carga

parasitária ( $1 \times 10^5$  tripomastigotas/animal) para fins de estudo em fase aguda. A mortalidade dos animais tratados com nitazoxanida, assim como o grupo não tratado (controle) foi acompanhada por até 15 dias pós-tratamento. Apesar de se observar uma sobrevida de 80% do grupo tratado com NTZ após 3 dias de tratamento (dados similares ao grupo controle), a sobrevida do grupo controle se mostrou nitidamente maior em comparação ao grupo tratado com NTZ, onde 40% dos animais do grupo controle apresentavam sobrevida após 6 dias do término do tratamento, contra 100% de mortalidade observada no grupo tratado com NTZ no mesmo período.

O fármaco NTZ vem demonstrando atividade para outros protozoários. Um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2010), demonstrou a atividade anti-*Leishmania donovani* da NTZ em camundongos infectados, onde observou uma dose efetiva 50% ( $DE_{50}$ ) de aproximadamente 100 mg/kg/dia quando o fármaco foi administrado pela via oral por 10 dias consecutivos. Em nossos estudos, a diminuição da sobrevida do grupo tratado com NTZ, poderia ser explicada por uma possível toxicidade do fármaco, uma vez que se administrou a NTZ a 50 mg/kg/dia pela via intraperitoneal. Debache e colaboradores (2011) observaram mortalidade de 100% dos camundongos tratados por três dias com NTZ na dose de 150 mg/kg/dia pela via intraperitoneal, apesar do fármaco apresentar uma dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) maior que 10 g/kg por via oral em ratos (Murphy e Friedmann, 1985). Considerando ainda que NTZ atinja uma concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de 10  $\mu$ g/mL após administração oral em adultos com função renal normal (DrugBank, 2014), o fármaco quando administrado em nosso modelo pela via intraperitoneal, pode ter atingido uma  $C_{max}$  mais elevada, justificando um aumento da mortalidade. Além disso, a administração pela via intraperitoneal poderia aumentar a toxicidade ao fígado de um fármaco potencialmente hepatotóxico como a NTZ (Murphy e Friedmann, 1985), visto que fármacos administrados por esta via atingem primeiramente o sistema hepático do que a circulação sanguínea por meio da drenagem linfática dos vasos mesentéricos (Turner et al., 2011). Considerando que a meia vida plasmática ( $T_{1/2}$ ) da NTZ,

particularmente de seu metabólito ativo, a tizoxanida, é de 1,9 h (Balderas-Acata et al., 2011), o esquema terapêutico adotado (1x ao dia) em nosso estudo, poderia também ser ampliado, visando a manutenção de níveis terapêuticos mais adequados durante o tratamento dos animais infectados com *T. cruzi*. Porém, constatando-se uma redução, ainda que não significativa, na parasitemia dos animais tratados com NTZ, sugere-se que a utilização de diferentes regimes de tratamento, com aumento do número de dias, assim como doses diferentes e vias de administração diferentes, poderiam contribuir para um possível aumento da efetividade do fármaco. Esquemas terapêuticos experimentais mais prolongados, como por exemplo 15 dias de tratamento (Miguel et al., 2010), ou mesmo 20 dias de tratamento (da Silva Ferreira et al., 2013; Araujo et al., 2000), vem sendo propostos, aumentando as chances de sucesso terapêutico de novos candidatos a fármacos. Ainda assim, a nitazoxanida foi avaliada pela primeira vez na doença de Chagas experimental em fase aguda, e poderia ser testada em futuros ensaios utilizando diferentes modelos experimentais e terapêuticos, além de ser incluída em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Em nosso trabalho, realizamos também um estudo comparativo para avaliar a parasitemia de camundongos infectados com a cepa Y, utilizando o método de contagem por microscopia óptica (Brener, 1962), assim como utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (Qvarnstrom et al., 2012). Nosso estudo demonstrou que os dados obtidos da qPCR corroboraram os dados de parasitemia obtidos pelo método clássico de Brener. Além disso, a qPCR vem sendo amplamente utilizada em estudos para avaliação do tratamento de pacientes com doença de Chagas (Muñoz et al., 2013; Cura et al., 2013; Buekens et al., 2013; Duffy et al., 2013). Nossos estudos corroboram o potencial da qPCR como uma importante metodologia para avaliações futuras do potencial terapêutico de novos fármacos no modelo experimental murino, possibilitando uma redução do tempo de avaliação do tratamento, assim como a ampliação do número de candidatos a fármacos testados.

## 6 CONCLUSÕES

- 1- Dentre os 54 fármacos estudados, 17 apresentaram atividade contra formas tripomastigotas e 5 apresentaram atividade contra as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (cepa Y).
- 2- Dentre os fármacos ativos, 17 demonstraram toxicidade para células de mamífero, com Concentração Citotóxica 50% variando entre 11,55 e >200 uM.
- 3- Dentre os 17 fármacos que apresentaram atividade anti-*T. cruzi* destacaram-se como os mais ativos, os antiarrítmicos, antihipertensivos, antagonistas de receptor de H1, antiparasitários, antiestrogênio e antidepressivos.
- 4- A combinação terapêutica *in vitro* entre os fármacos nitazoxanida e sertralina em formas tripomastigotas demonstrou uma associação indiferente.
- 5- O fármaco sertralina não apresentou atividade anti-*T. cruzi* no modelo animal quando testado por 5 dias consecutivos a 40 mg/kg, como também não aumentou a sobrevivência dos animais quando comparado ao grupo não tratado (controle).
- 6- O fármaco nitazoxanida reduziu a parasitemia em 29% ( $p > 0.05$ ) dos animais infectados com *T. cruzi*, quando comparado ao grupo não tratado (controle), porém não aumentou a sobrevivência dos animais quando comparado ao grupo não tratado (controle).
- 7- O estudo experimental para avaliação da parasitemia no modelo de camundongo Swiss, demonstrou que os dados obtidos pela técnica de qPCR, corroboram os dados da técnica de microscopia óptica de Brener, apontando similaridade entre as análises.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gürtler RE: Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? MemInst Oswaldo Cruz 2013, 108(2):251–254.

Akhavan D. Cost-effectiveness Analysis of the Project for Controlling Chagas Disease in Brazil—Final Report. Pan American Health Organization, Brasília (2000).

Andrade AC, Leite ICG, Vieira MT, Coimbra ES, Tibiriçá SHC, Rodrigues V O. Ensaio clínico randomizado controlado duplo-cego da nitazoxanida no tratamento do poliparasitismo intestinal. Cad Saúde Colet 2011; 19: 139-46.

Apt W, Arribada A, Zulantay I, Solari A, Sánchez G, Mundaca K, Coronado X, Rodríguez J, Gil LC, Osuna A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. Ann Trop Med Parasitol. 2005 Dec;99(8):733-41.

Apt W, Zulantay I. [Update on the treatment of Chagas' disease]. Rev Med Chil. 2011 Feb;139(2):247-57. doi: /S0034-98872011000200016. Epub 2011 Jul 11.

Araújo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. J Antimicrob Chemother. 2000 Jun;45(6):819-24.

Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. MemInst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104Suppl 1:9-16.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:673-83.

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 Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2034-9.

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.

Bajorath J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discovery*. 2002, 1: 882–94.

Balderas-Acata, JI, Ríos-Rodríguez Bueno, EP, Castillo-García, SD, Espinosa-Martínez, C, Burke-Fraga, V, González-de la Parra, M. Bioavailability of Two Coated-Tablet Formulations of a Single Dose of Pantoprazole 40 mg: An Open-Label, Randomized, Two-Period Crossover, Comparison in Healthy Mexican Adult Volunteers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 2011 3(5).

Ballard TE, Wang X, Olekhovich I, Koerner T, Seymour C, Hoffman PS, Macdonald TL. Biological activity of modified and exchanged 2-amino-5-nitrothiazole amide analogues of nitazoxanide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Jun 15;20(12):3537-9.

Benaim G, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Plaza-Rojas L, Silva ML, Parra-Gimenez N, Garcia-Marchan Y, Paniz-Mondolfi A, Uzcanga G. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3720-5.

Bleicher KH, Bohm HJ, Muller K, Alanine AI. Hit and Lead generation: Beyond highthroughput screening. *Nat RevDrug Discovery*. 2003, 2: 369–78.

Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas, 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosomacruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1962 Nov-Dec;4:389-96. PubMed PMID: 14015230.

Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizán JM, Carlier Y, Ciganda A, Dumonteil E, Gamboa-Leon R, Howard E, Matute ML, Sosa-Estani S, Truyens C, Wesson D, Zuniga C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: study protocol. *Reprod Health*. 2013 Oct 11;10:55.

Carrilero B, Murcia L, Martínez-Lage L, Segovia M. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *VerEspQuimioter*. 2011;24:123-6.

Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoebahistolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol*. 2002 May-Jun;49(3):201-8.

Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosomacruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Dec;40(6):527-32.

Center for Disease Control and Prevention. Trypanosomiasis American [citado 2013. Ago 08]. Disponível em:  
<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/trypanosomiasisamerican.htm>.

Chagas E. Infection expérimental de l'homme par le *Trypanosoma cruzi*. Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales, 1933; 115:1339-1341.

Chan-Bacab MJ, Hernández-Núñez E, Navarrete-Vázquez G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2 yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. J Antimicrob Chemother. 2009 Jun;63(6):1292-3.

Chippaux JP, Clavijo AN, Santalla JA, Postigo JR, Schneider D, Brutus L: Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. Trop Med Int Health 2010, 15(1):87–93.

Chong CR, Xu J, Lu J, Bhat S, Sullivan DJ Jr, Liu JO. Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. ACS Chem Biol. 2007 Apr 24;2(4):263-70.

Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol, 2006; 177(5):3193-3200.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Rev Soc Bras Med Trop 2012, 45(3):286–296.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:3-24.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002;18:171-6.

Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104(4):549–554.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006, 123: 399-410.

Cura CI, Lattes R, Nagel C, Gimenez MJ, Blanes M, Calabuig E, Iranzo A, Barcan LA, Anders M, Schijman AG. Early molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi*-infected donors. *Am J Transplant.* 2013 Dec;13(12):3253-61.

Cutrim FS, Almeida IA, Gonçalves Eda G, Silva AR. [Chagas' disease in the State of Maranhão, Brazil: record of acute cases from 1994 to 2008]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Nov-Dec;43(6):705-8.

da Silva Ferreira D, Esperandim VR, Toldo MP, Kuehn CC, do Prado Júnior JC, Cunha WR, e Silva ML, de Albuquerque S. In vivo activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 2013 Aug;134(4):455-9.

da Silva RA, Mercado VTC, Barbosa GL, Cortiço VL, Rodrigues C, Wanderley DMV. *Bepa ed.* 87, 2011;8(87):4-13.

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 Oct;129(2):95-100.

Démolis JL, Angebaud P, Grangé JD, Coates P, Funck-Brentano C, Jaillon P. Influence of liver cirrhosis on sertraline pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol*. 1996 Sep;42(3):394-7.

Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD: Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectiva no desenvolvimentode novos fármacos. *Quím Nova* 2009, 32(9):2444–2457.

Dias, JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2006, v.22(10), p.2020-2021.

Dias JC. [Globalization, inequity and Chagas disease]. *CadSaude Publica*. 2007;23 Suppl 1:S13-22.

Diniz Lde F, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, Talvani A, Ribeiro I, Bahia MT. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Aug 15;7(8):e2367.

DNDi, Drug for Neglected Diseases initiative. Chagas Disease: estratégia da DNDi para na America Latina. [acesso em 08 de março de 2014]. Disponível em <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>.

DrugBank. [acesso em 13 de setembro de 2013]. Disponível em <http://www.drugbank.ca/>.

DrugBank. [acesso em 08 de março de 2014]. Disponível em <http://www.drugbank.ca/>.

Duan, Q. Peng, N. Masuda. “Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington’s disease,” *Neurobiology of Disease*, 2008, vol. 30, no. 3, pp. 312–322.

Dueñas-González A, García-López P, Herrera LA, Medina-Franco JL, González-Fierro A, Candelaria M. The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Mol Cancer* 2008;7:82.

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of Trypanosomacruzi satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2000.

Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today*. 2011 Apr;16(7-8):298-310.

Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: Trypanosomacruzi I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Aug;103(5):514-6.

Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc*. 2011 Sep;83(3):1041-4.

Fitarelli DB, Horn JF: Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para doença de Chagas em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre-RS. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009, 31(5):310–314.

Fivelman QL, Adagu SI, Warhurst DC. Modified Fixed-Ratio Isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil

or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; 11: 4097–4102.

Freeman J, Baines SD, Todhunter SL, Huscroft GS, Wilcox MH. Nitazoxanide is active against *Clostridium difficile* strains with reduced susceptibility to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jun;66(6):1407-8.

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. [Citado 2014. Abril 10]. Disponível em:  
[http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/panorama\\_historico.html](http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/panorama_historico.html)

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. [Citado 2013. Ago 08]. Disponível em:  
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug;115(1-2):22-7.

Gehrke SS, Pinto EG, Steverding D, Pleban K, Tempone AG, Hider RC, Wagner GK. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. *Bioorg Med Chem.* 2013 Feb 1;21(3):805-13.

Grant IH, Gold JW, Wittner M, Tanowitz HB, Nathan C, Mayer K, Reich L, Wollner N, Steinherz L, Ghavimi F, et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med.* 1989 Nov 15;111(10):849-51.

Guttner Y, Windsor HM, Viiala CH, Dusci L, Marshall BJ. Nitazoxanide in treatment of *Helicobacter pylori*: a clinical and in vitro study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Dec;47(12):3780-3.

Hoffman PS, Sisson G, Croxen MA, Welch K, Harman WD, Cremades N, Morash MG. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Mar;51(3):868-76.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):1018-27.

Ianni BA, Mady Ch. [Treatment of the chronic form of Chagas disease. Is the etiologic treatment efficient?]. *Arq Bras Cardiol*. 1998 Oct;71(4):645-6.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C The endless race between *Trypanosomacruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2010, 12: e29.

Kesper N Jr, De Almeida KA, Stolf AM, Umezawa ES. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J Parasitol*. 2000;86:862-7.

Kirchhoff LV, Gam AA, Gilliam FC. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in Central American immigrants. *Am J Med*. 1987 May;82(5):915-20.

Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am*. 1996;25:517-33.

Korolkovas A. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Kumar P, Kumar A. "Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2009, vol. 33, no. 1, pp. 100–108.

Kumar VS, Sharma VL, Tiwari P, Singh D, Maikhuri JP, Gupta G, Singh MM. The spermicidal and antitrichomonas activities of SSRI antidepressants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006 May 1;16(9):2509-12.

Lal V. The neglected. *Ann Med Health Sci Res*. 2013 Apr;3(2):255-7.

Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Jenewein I, Ledochowski M. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Dec;48(6):775-9.

Lescure FX, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R, Guiard-Schmid JB, Bonnard P, Ajana F, Rolla V, Carlier Y, Gay F, Elghouzzi MH, Danis M, Pialoux G. Chagas disease, France. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):644-6.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G: Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010, 10(8):556–570.

Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Fernando Ferreira L, Araújo A, Vicente AC, Jansen AM. Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jun;14(6):1001-2.

Luque F, Fernández-Ramos C, Entrala E, Rosales MJ, Navarro JA, Romero MA, Salas JM, Sánchez-Moreno M. In vitro evaluation of newly synthesised [1,2,4]triazolo[1,5a]pyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*,

LeishmaniadonovaniandPhytomonasstaheli. CompBiochemPhysiol C ToxicolPharmacol. 2000 May;126(1):39-44.

Manak MM, Moshkoff DA, Nguyen LT, Meshki J, Tebas P, Tuluc F, Douglas SD. Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. AIDS. 2010 Nov 27;24(18):2789-96.

Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N, Russo M. Acute *Trypanosomacruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. Microbes and Infection, 2000,(2): 347–352.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV: Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation 2007, 115(9):1109–1123.

Marin-Neto JA, RassiJúniorA,AvezumJúniorA,MattosAC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. MemInst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (Suppl.I):319-24.

Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. PLoSNegl Trop Dis. 2012;6(2):e1508. A

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. J Infect Dev Ctries. 2012 Nov 26;6(11):817-24. B

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Lange W, Heukelbach J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. Trop Med Int Health. 2012 Sep;17(9):1066-75. D

Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosomacruzi and their interaction with the mammalian host. *CompBiochemPhysil* 2006; 1-20.

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 Trypanosomacruzi and their interaction with the mammalian host. *Comp BiochemPhysiol A MollIntegr Physiol*. 2007 Apr;146(4):601-20.

Mejia AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM. Benznidazole-resistance in Trypanosomacruzi is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J InfectDis*. 2012 Jul 15;206(2):220-8.

Mesquita JT, Tempone AG, Reimão JQ. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime(®), miltefosine and sitamaquine against Leishmania (Leishmania) infantum intracellular amastigotes. *Acta Trop*. 2013 Nov 13;130C:112-116.

Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol*. 2010 Jun;59(Pt6):641-7.

Miguel DC, Ferraz ML, Alves Rde O, Yokoyama-Yasunaka JK, Torrecilhas AC, Romanha AJ, Uliana SR. The anticancer drug tamoxifen is active against Trypanosoma cruzi in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Nov;105(7):945-8.

Ministério da Saúde. Nota técnica: doença de Chagas Aguda por transmissão oral, 2007. [acesso em 2013 novembro].Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_chagas2308.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf)>.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Estado da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. 2009.

Ministério da Saúde. Casos de doença de Chagas aguda (DCA). Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 2005 a 2009. [acesso em 2013 novembro]. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabchagas casos 0509.pdf>>.

Monteiro WM, Barbosa MGV, Toledo MJO, Fé FA, Fé NF. Série de casos agudos de doença de Chagas atendidos num serviço terciário de Manaus, Estado do Amazonas, de 1980 a 2006. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):207-10.

Moraes-Souza H: Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. MemInst Oswaldo Cruz 1999, 94(suppl. 1):419–423.

Muñoz MJ, Murcia L, Segovia M: The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. Expert RevAntilInfectTher 2011, 9(1):5–7.

Muñoz C, Zulantay I, Apt W, Ortiz S, Schijman AG, Bisio M, Ferrada V, Herrera C, Martínez G, Solari A. Evaluation of nifurtimox treatment of chronic chagas disease by means of several parasitological methods. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Sep;57(9):4518-23.

Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S, García-Rodríguez JA. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Apr;14(3):177-80.

Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M: Diagnóstico y tratamiento de La enfermedad de Chagas. *EnfermInfeccMicrobiolClin*2013, 31(Suppl.1):26–34.

Murphy JR, Friedmann JC. Pre-clinical toxicology of nitazoxanide--a new antiparasitic compound. *J Appl Toxicol*. 1985 Apr;5(2):49-52.

Navarrete-Vazquez G, Chávez-Silva F, Argotte-Ramos R, Rodríguez-Gutiérrez Mdel C, Chan-Bacab MJ, Cedillo-Rivera R, Moo-Puc R, Hernández-Nuñez E. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011, 10: 3168-71.

Nickerson P, Orr P, Schroeder ML, Sekla L, Johnston JB. Transfusion-associated Trypanosomacruzi infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med*. 1989 Nov 15;111(10):851-3.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009 Apr;15(4):653-5.

Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL; Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am CollCardiol*. 2013 Aug 27;62(9):767-76.

O'Connor KA, Roth BL. Finding new tricks for old drugs: An efficient route for public-sector drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:1005-14.

Odds FC. Synergy, antagonism and what the checkerboard puts between them. *J antimicrob Chemother* 2003; 52:1.

Oldfield E. Targeting isoprenoid biosynthesis for drug discovery: bench to bedside. *Acc Chem Res.* 2010 Sep 21;43(9):1216-26.

Oliveira GC, Lopes LR, Andreollo NA, Braga NS, Neto JSC: Tratamento cirúrgico do megaesôfago no Hospital de Clínicas da UNICAMP – fatores associados a melhores ou a piores resultados. *RevColBrasCir* 2009, 36(4):300–306.

Oliveira MF, Dias ATN, Pontes VMO, Souza Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Rev Patol Trop.* 2008;37(3):209-28.

Organização Mundial de Saúde. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de reunión de especialistas. OPC/HCP/HCT/140/99, Rio de Janeiro, 32 p., 1998. In: *Revista de Patologia Tropical* 1999, (28): 247-279.

Padhy BM, Gupta YK. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *J Postgrad Med.* 2011 Apr-Jun;57(2):153-60.

Palit P, Ali N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):1120-4.

Peng Q, Masuda N, Jiang M, Li Q, Zhao M, Ross CA, Duan W. The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Exp Neurol.* 2008 Mar;210(1):154-63.

Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2013 Dec 19;19(1):34.

Pereira-Chioccola, VL. Papel da resposta imune à Tras-sialidase na infecção por *Trypanosoma cruzi* São Paulo; s.n; 1998.139p.

Pimentel Wde S, Ramires FJ, Lanni BM, Salemi VM, Bilate AM, Cunha-Neto E, Oliveira AM, Fernandes F, Mady C. The effect of beta-blockade on myocardial remodelling in Chagas' cardiomyopathy. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012 Sep;67(9):1063-9.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet, Infect. Dis*. 2001(1) 92–100.

PubChem Compound. [acesso em 10 de novembro de 2013]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>.

Py M. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2011(11): 536–542.

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(7):e1689.

Ramírez-Macías I, Marín C, Chahboun R, Messouri I, Olmo F, Rosales MJ, Gutierrez-Sánchez R, Alvarez-Manzaneda E, Sánchez-Moreno M. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of four terpenoid derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Sep;87(3):481-8.

Ramos Jr. AN, Martins-Melo FR, Barbosa JC, Heukelbach J. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of

Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 43 (Suppl. 2) (2010), pp. 12–17.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA Chagas disease. Lancet 2010(375):1388–1402.

Rassi A, Luquetti AO, Rassi A Jr, Rassi GG, Rassi SG, DA Silva IG, Rassi AG. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. Am J Trop Med Hyg. 2007 Jan;76(1):58-61.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012 Jun;26(2):275-91.

Reimão JQ, Tempone AG. Investigation into *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106:1032-8.

Reimão JQ, Migotto AE, Kossuga MH, Berlinck RG, Tempone AG. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoariisei*. Parasitol Res. 2008 Nov;103(6):1445-50.

Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccia VL, Tempone AG. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Exp Parasitol. 2012 Mar;130(3):195-9.

Rey, L. Parasitologia. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rey L: *Parasitologia. 4ª edição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Rossignol, J.F.; Abu-Zekry, M.; Hussein, A.; Santoro, M.G. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*, **2006**, 368, 124-129.

Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci*. 2012 Mar;101(3):888-94. doi: 10.1002/jps.23010. Epub 2011 Dec 12.

Santello, Fabricia Helena. Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2009. 122p.: il.;30cm.

Sasagawa E, Aguilar AV, Ramírez MA, Chévez JE, Nakagawa J, Cedillos RA, Kita K. Acute Chagas disease in El Salvador 2000-2012 - Need for surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Apr;109(2):256-8.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA: Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104(Suppl 1):246–251.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010 Jul-Aug;115(1-2):14-21.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102Suppl 1:75-85. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Dec;102(8):2 p following 1009.

Shahinas D, Liang M, Datti A, Pillai DR. A repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90. *J Med Chem*. 2010 May 13;53(9):3552-7.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB: Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis 2012, 54(6):845–852.

Silistino-Souza R, Alevi KC, Castro NF, Freitas MN, Papa MD, Scandar SA, Bestetti RR, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MT. Entoepidemiology of Chagas disease in northwest São Paulo and cytogenetic analysis of its main vector, *Triatoma sordida*(Hemiptera: Triatominae). Genet Mol Res. 2013 Nov 22;12(4):5810-9.

Silveira AC, Pimenta F Jr: Institutional Insertion of Chagas' disease control. Rev Soc Bras Med Trop 2011, 44(Suppl. 2):19–24.

Silveira A, Vinhaes M. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. MemInst Oswaldo Cruz. 1999;94Suppl 1:405-11.

Sleigh SH, Barton CL. Repurposing strategies for therapeutics. Pharm Med 2010;24:151-9.

Sprouse J, Clarke T, Reynolds L, et al. Comparison of the effects of sertraline and its metabolite demethylsertraline on blockade of central 5-HT reuptake in vivo. Neuropsychopharmacology. 1996;14:225–231.

Soares Sobrinho JL, Medeiros FPM, de La Roca MF, Silva KER, Lima LNA, Rolim Neto JR. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas. RevPatolTrop. 2007;36(2):103-18.

Solari A, Saavedra H, Sepúlveda C, Oddó D, Acuña G, Labarca J, Muñoz S, Cuny G, Brengues C, Veas F, et al. Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS. Clin Infect Dis. 1993 Feb;16(2):255-9.

Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(Suppl.1):167-80.

Souza-Lima Rde C, Barbosa Md, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento Ada S, 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 Jul-Aug;46(4):510-4.

Sowunmi A, Oduola AM, Ogundahunsi OA, Falade CO, Gbotosho GO, Salako LA. Enhanced efficacy of chloroquine-chlorpheniramine combination in acute uncomplicated falciparum malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Jan-Feb;91(1):63-7.

Speich B, Ame SM, Ali SM, Alles R, Hattendorf J, Utzinger J et al. Efficacy and safety of nitazoxanide, albendazole, and nitazoxanide-albendazole against *Trichuris trichiura* infection: a randomized controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1685.

Stafstrom CE. Mechanisms of action of antiepileptic drugs: the search for synergy. *Curr Opin Neurol* 2010; 2:157-63.

Stendel M, Dias JCP, Romanha AJ. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. *Ciência Hoje*, 2005, v.37, n.217, p.32-37.

Strauss M, Lo Presti MS, Bazán PC, Baez A, Fauro R, Esteves B, Sanchez Negrete O, Cremonezzi D, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int*. 2013 Jun;62(3):293-9.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 2002, 28: 1739-46.

Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Apr 26;5(4):e1136.

Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M, Svoboda M. *Trypanosomacruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental parasitology*, 2006, v.114, p.279- 288.

Tempone AG, Oliveira CM, Berlinck RGS. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med* 2011; 77: 572-85.

Teran, C.G.; Teran-Escalera, C.N.; Villarroel, P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int. J. Infect. Dis.*, **2009**, 13, 518-523.

Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet.* 2002;359:2188-94.

Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011 Sep;50(5):600-13.

Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Géant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 26;101(43):15364-9.

Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JF, de Barros Moreira TL, de Carvalho TM, Urbina JA, de Souza W. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosomacruzi*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Jul;40(1):61-71.

Wanderley DM, Rodrigues VL, Leite RM, Diaz SY, de Carvalho ME, Santos SO, Tatto E, Carli MS, Coelho KI, da Silva PR, Túlio SA, da Silva IR, Shikanai-Yasuda MA. On an acute case of Chagas disease in a region under vector control in the state of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010 May-Jun;52(3):151-6.

Wang X, Douglas SD, Lai JP, Tuluc F, Tebas P, Ho WZ. Neurokinin-1 receptor antagonist (aprepitant) inhibits drug-resistant HIV-1 infection of macrophages in vitro. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007 Mar;2(1):42-8.

Weis R, Schweiger K, Faist J, Rajkovic E, Kungl AJ, Fabian WM, Schunack W, Seebacher W. Antimycobacterial and H1-antihistaminic activity of 2-substituted piperidine derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2008 Dec 15;16(24):10326-31.

World Health Organization. Chagas' disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in March 2013).

Woody NC, Woody HB. American trypanosomiasis (Chagas' disease); first indigenous case in the United States. *J Am Med Assoc*. 1955 Oct 15;159(7):676-7.

Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3758-66.

Zhang R, Shang L, Jin H, Ma C, Wu Y, Liu Q, Xia Z, Wei F, Zhu XQ, Gao H. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of nitazoxanide against *Leishmaniadonovani*. *Parasitol Res.* 2010 Jul;107(2):475-9.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR: The revised *Trypanosomacruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *InfectGenetEvol* 2012, 122:240-253.

Zingales B: *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? *RevBiol* 2011, 6b:44–48.

# 8 ANEXOS



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 24 de fevereiro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 03/2011

Prezado Senhor,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa "**Estudo de Novas Combinações Terapêuticas na Doença de Chagas**", sob sua coordenação, foi considerado **APROVADO**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e encaminhar ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Adriano Abbud  
Coordenador da CEUA-IAL/Pasteur

Ilmo. Sr.  
Dr. André Gustavo Tempone Cardoso  
Pesquisador Científico  
Centro de Parasitologia e Micologia  
Instituto Adolfo Lutz

AA.aa.

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355  
107 Andar - Sala 1018/1020 - Cerveira César  
São Paulo - SP - CEP: 01246-902  
Tel. (11) 3068-2881 - e-mail: ceua@ial.sp.gov.br



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CTC / IAL



Projeto nº 00740-2010 (Protocolo 149863/2010)

**Estudo de novas combinações terapêuticas na Doença de Chagas**

Coordenação: André Gustavo Tempone Cardoso

Senhor Coordenador,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pelo CEUA-IAL/Pasteur.

ADRIANA BUGNO  
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 18 de Agosto de 2011

1ª.ª.ª. CTC/IAL  
2ª.ª.ª. Coordenador