

ISABELA TERESA SANTOS CORRÊA

**Mecanismo de Ação do Anti-hipertensivo Manidipino
em *Trypanosoma cruzi*: Uma Abordagem de Reposicionamento
de Fármaco**

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.

Coorientadora: Dra. Thaís Alves da Costa Silva

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Corrêa, Isabela Teresa Santos

Mecanismo de ação do anti-hipertensivo manidipino em *trypanosoma cruzi*: uma abordagem de reposicionamento de fármaco/ Isabela Teresa Santos Corrêa. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

Co-orientadora: Dra. Thais Alves da Costa Silva.

1. Bloqueadores dos canais de cálcio.
2. Reposicionamento de medicamentos.
3. Doença de chagas.

SES/CCD/CD - 423/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

***Aos meus familiares, grandes
incentivadores e exemplos de vida.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, que através da força do teu espírito, me fez superar as dificuldades encontradas no caminho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências, da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado de Saúde de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado, e ao Instituto Adolfo Lutz por toda estrutura cedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso, pela oportunidade, dedicação, confiança e instrução ao longo destes dois anos.

À minha coorientadora Dra. Thaís Alves da Costa Silva por todo apoio, pelos ensinamentos, supervisão e aprendizado.

Ao grupo do Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, pelo carinho, pela paciência com que me ensinaram, por todo suporte, companheirismo e trabalho em equipe.

À toda minha família, especialmente meu pai Carlos e meu irmão Mateus, por me incentivarem e proporcionarem todo amor e suporte necessário para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

Ao Elizio, por ser o melhor companheiro em tudo que preciso, me apoiando para a realização deste momento.

Aos meus amigos e todos aqueles que de alguma forma contribuíram e torceram pela concretização deste trabalho.

“Cada sonho que você abandona é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”
(Steve Jobs)

RESUMO

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, com aproximadamente 70 milhões de pessoas em áreas de risco. Causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, a DC é um problema de saúde pública, ocorrendo do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. Considerando a falta de terapia eficaz e segura para o tratamento da DC, e baseado em um efeito letal do fármaco anti-hipertensivo manidipino, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), este fármaco foi avaliado *in vitro* contra as formas tripomastigotas (extracelulares) e amastigotas (intracelulares) de *Trypanosoma cruzi*. O perfil bioenergético de tripomastigotas de *T. cruzi* foi estudado na presença do fármaco manidipino, utilizando ensaios fluorimétricos e luminescentes. O manidipino mostrou uma elevada atividade antiparasitária, com valores de CE_{50} de 0,1 μ M em amastigotas intracelulares, e 3 μ M em tripomastigotas, resultando em um índice de seletividade em formas amastigotas intracelulares promissor de > 2.000 . Utilizando análise por citometria de fluxo, o fármaco mostrou despolarização do potencial elétrico da membrana plasmática, sem alteração da permeabilidade. Uma diminuição dos níveis de ATP sugeriu uma alteração bioenergética da mitocôndria, o que foi confirmado pela despolarização do potencial da membrana mitocondrial e aumento dos níveis de ROS. Logo, o fármaco anti-hipertensivo manidipino mostrou pela primeira vez uma efetividade *in vitro* promissora contra *T. cruzi* e pode representar um bom candidato para futuras investigações em modelos animais.

Palavra-chave: manidipino; bloqueador de canais de cálcio; reposicionamento de fármacos; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas Disease (CD), also known as American trypanosomiasis affects about 6 to 7 million people worldwide, with approximately 70 million people in risk areas. Caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, CD is a public health problem, occurring from the southern United States to northern Argentina. Considering the lack of effective and safe therapy for the treatment of CD, and based on a specific biochemical effect of a approved drug by Food and Drug Administration (FDA), the antihypertensive drug manidipine was *in vitro* evaluated against the trypomastigotes (extracellular) and intracellular (amastigotes) of *Trypanosoma cruzi*. The bioenergetics of trypomastigotes was studied in the presence of the drug using fluorimetric and luminescent assays. Manidipine showed a potent antiparasitic activity, with IC₅₀ values of 0.1 µM (intracellular amastigotes) and 3 µM (trypomastigotes), resulting in a promising selectivity index against intracellular amastigotes (>2.000). Using flow cytometry analysis, the drug showed depolarization of electric potential of the plasma membrane, with no alteration of the permeability. A decrease of the ATP levels suggested a bioenergetics alteration of the mitochondria, which was confirmed by depolarization of the mitochondrial membrane potential and increased levels of ROS. The antihypertensive manidipine showed for the first time a promising *in vitro* effectiveness against *T. cruzi* and may represent a candidate for future investigations in animal models.

Keywords: manidipine, calcium channel blocker, drug repositioning; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Monofosfato de Adenosina
ATC.....	American Type Culture Collection (Coleção Americana de Cultura de Células)
ATP.....	Trifosfato de Adenosina
BCC	Bloqueadores de Canais de Cálcio
Bisoxonol	Ácido bis-(1,3-dimetil tiobarbitúrico) trimetil oxonol
BL-1	Filtro de Emissão de 530 nm
BL-2	Filtro de Emissão de 574 nm
Ca ²⁺	Íon de Cálcio
CBA.....	<i>Cytometric Bead Array</i> (kit com microesferas para detecção de citocinas por citometria de fluxo)
CC ₅₀	Concentração Citotóxica 50%
CCCP.....	Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CO ₂	Dióxido de Carbono
CYP	Citocromo P450
DC	Doença de Chagas
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNDi	Drug for Neglected Diseases Initiative (Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas)
DP	Desvio Padrão
ECG	Eletrocardiograma
FDA	Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)
GSH	Glutathiona
H ⁺	Íon de Hidrogênio

H2DCFDA	2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz de São Paulo
IF	Índice de Infecção
IS	Índice de Seletividade
JC-1...	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1'-3,3'Tetraetilbenzimidazolil carbocianina
Mg ²⁺	Ion de Magnésio
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	Íon de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NO ²⁻	Nitrito
O ₂	Gás Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PMCA	Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase
PPAR-γ	Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucléico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TPP	Target Product Profile
Δψp	Potencial de Membrana Plasmática
Δψm	Potencial de Membrana Mitocondrial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de fármacos reposicionados atualizados e ano de aprovação (Novac, 2013)32

Tabela 2- Atividade anti-*T. cruzi* e citotoxicidade em células de mamíferos dos fármacos manidipino e benznidazol51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Distribuição mundial de áreas endêmicas e não endêmicas para doença de Chagas. Fonte: DNDi América Latina.....17
- Figura 2-** Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, em destaque para Região Amazônica de 2005 a 2013. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015.....18
- Figura 3-** Distribuição quantitativa de triatomíneos capturados nos municípios de 2007 a 2011. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015.....19
- Figura 4-** Morfologia do *Triatoma infestans*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.....20
- Figura 5-** Formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2017.....21
- Figura 6-** Formas amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Original de Isabela Teresa Santos Corrêa.....22
- Figura 7-** Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2017.....23
- Figura 8-** Ciclo de transmissão do *T. cruzi*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention, 2013.....25
- Figura 9-** Pacientes apresentando sintomas referente a doença de Chagas aguda. A- sinal de Romanã, B- chagoma de inoculação cutânea. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.....26
- Figura 10-** Estrutura química do nifurtimox. Fonte: Drugbank, 2020.....28
- Figura 11-** Estrutura química do benznidazol. Fonte: DruBank, 2020.....29
- Figura 12-** Estrutura química do fármaco manidipino. Fonte: DrugBank, 2020.....34

Figura 13 - Esquema ilustrativo estrutural da mitocôndria. Fonte: Original de LHSC, 2012.....	36
Figura 14 - Modelo esquemático da regulação de Ca ²⁺ em tripanossomatídeos. Fonte: Benaim, 2011.....	39
Figura 15 - Reações para a detecção de fluorescência para metragem dos níveis de espécies reativas de oxigênio pelo fluoróforo H2DCFDA. Fonte: LeBel <i>et al.</i> , 1992.....	48
Figura 16 - Reações para a detecção de luz, na metragem dos níveis de ATP pelo método de bioluminescência luciferina-luciferase. Fonte: Johnson & Spence, 2010.....	49
Figura 17 - Imagens digitais de microscopia óptica (EVOS M5000, Thermo) obtida de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
Figura 18 - Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática através da sonda Sytox Green.....	53
Figura 19 - Avaliação do potencial elétrico da membrana plasmática ($\Delta\Psi_p$) através da sonda DISBAC2 (3) em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 20 - Avaliação do potencial da membrana mitocondrial em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	55
Figura 21 - Avaliação dos níveis de ATP.....	56
Figura 22 - Avaliação dos níveis de ROS em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	57

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Doenças Negligenciadas	16
1.2 Doenças de Chagas	16
1.2.1 Histórico.....	16
1.2.2 Epidemiologia	16
1.2.3 Vetores.....	20
1.2.4 Agente Etiológico.....	21
1.2.5 Ciclo Biológico.....	23
1.2.6 Patogenia.....	25
1.2.6.1 Fase Aguda.....	26
1.2.6.2 Fase Crônica.....	27
1.2.7 Tratamento.....	27
1.2.7.1 Nifurtimox.....	28
1.2.7.2 Benznidazol.....	29
1.3 Pesquisa de Novas Quimioterapias	29
1.3.1 O Reposicionamento de Fármacos.....	30
1.3.1.1 Manidipino.....	33
1.4 Mecanismo de Ação	34
1.4.1 Membrana Plasmática	35
1.4.2 Mitocôndria	36
1.5 Bloqueadores de Canais de Cálcio.....	38
1.6 Justificativa.....	40
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos Gerais.....	41
2.2 Objetivos Específicos	41

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Reagentes e Fármacos.....	42
3.2 Animais de Experimentação.....	42
3.3 Parasitas e Células.....	42
3.4 Estudo de Eficácia <i>in vitro</i>	43
3.4.1 Amastigotas Intracelulares.....	43
3.4.2 Tripomastigotas.....	44
3.5 Determinação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	44
3.6 Determinação do Índice de Seletividade	44
3.7 Estudo do Mecanismo de ação.....	44
3.7.1 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática.....	45
3.7.2 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$).....	46
3.7.3 Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	46
3.7.4 Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	47
3.7.5 Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)	48
3.8 Análises Estatísticas.....	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e Citotoxicidade em Mamíferos.....	50
4.2 Mecanismo de Morte Parasitária.....	52
4.2.1 Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática.....	52
4.2.2 Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$).....	53
4.2.3 Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	54
4.2.4 Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)	55
4.2.5 Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	56

5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS.....	82

1- INTRODUÇÃO

1.1- Doenças Negligenciadas

Desenvolvendo-se em climas quentes e úmidos, as doenças tropicais negligenciadas, geralmente endêmicas em populações de baixa renda e causadas por agentes infecciosos ou parasitas, atingem cerca de 1,4 bilhões de pessoas, gerando um forte impacto na economia e problemas a Saúde Pública. Aliado ao desinteresse do setor farmacêutico privado em desenvolver novas terapias, a pobreza e precariedade do atendimento clínico geram dificuldades para ações efetivas de tratamento e erradicação dessas doenças (Croft & Olliaro, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 18 doenças encontram-se priorizadas, incluindo a doença de Chagas (DC) (WHO, 2020).

1.2- Doença de Chagas

1.2.1- Histórico

Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença de Chagas recebeu esse nome em homenagem ao pesquisador brasileiro Carlos Chagas, seu descobridor. É uma doença parasitária, descoberta em 1909, decorrente da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado, que apresenta insetos triatomíneos como vetores (FioCruz, 2017).

A DC originou-se das mudanças de hábitos das populações desde o período pré-histórico, cerca de seis mil anos atrás, quando passaram a trabalhar com agricultura e domesticar animais. (Ferreira *et al.*, 2011). Dados esses confirmados pela paleoparasitologia e biologia molecular (Aufderheide *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009).

1.2.2- Epidemiologia

Em termos de distribuição global, encontrada em áreas endêmicas de 21 países da América Latina (**Figura 1**), a DC atinge de 6 a 7 milhões de pessoas na América Latina, com 70 milhões em risco de contrair a doença, apresentando por volta de 14.000 mortes registradas por ano (DNDi América

Latina). No Brasil, cerca de 2-3, milhões de pessoas estão infectadas, com uma taxa de mortalidade anual de aproximadamente 6.000 indivíduos (DNDi América Latina).



Figura 1- Distribuição mundial de áreas endêmicas e não endêmicas para doença de Chagas. Fonte: DNDi América Latina.

No território brasileiro, no período entre 2005 e 2013, 112 surtos foram identificados, sendo 35 abrangendo municípios da Região Amazônica (**Figura 2**). Foi observado a ingestão de alimentos como açaí (*Euterpe oleracea*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), caldo de cana (*Saccharum officinarum*) e babaçu (*Attalea ssp.*) contaminados com *T. cruzi* como a fonte mais provável de infecção. Grande parte dos surtos foram encontrados nos estados do Pará 75,9% (85) e Amapá 12,5% (14) e, em menores proporções, nos estados do Amazonas 4,5% (5), Tocantins 1,8% (2) e Bahia 1,8% (2) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015).

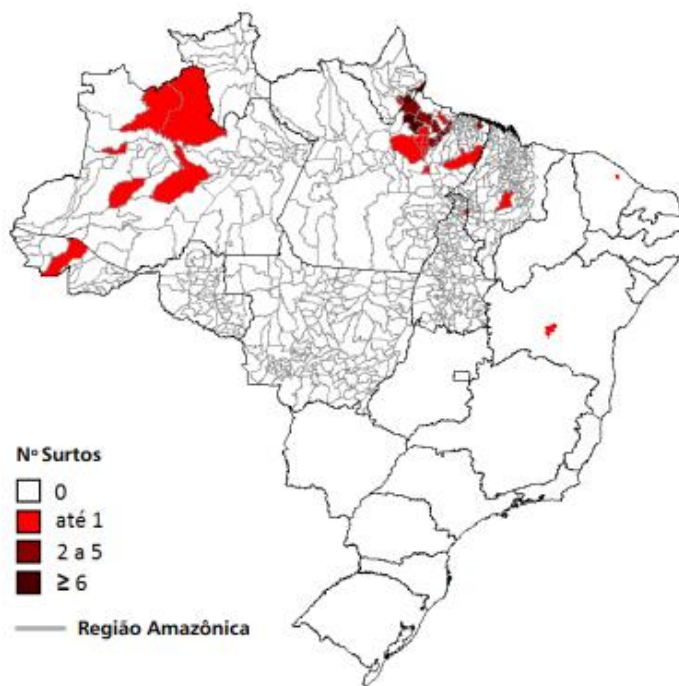


Figura 2- Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, em destaque para Região Amazônica de 2005 a 2013. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015.

Em relação ao controle vetorial, é interessante mencionar que de 2007 a 2011, 770.000 triatomíneos foram registrados e capturados por meio da vigilância entomológica dos estados (**Figura 3**), permitindo a percepção da incidência de novos casos.

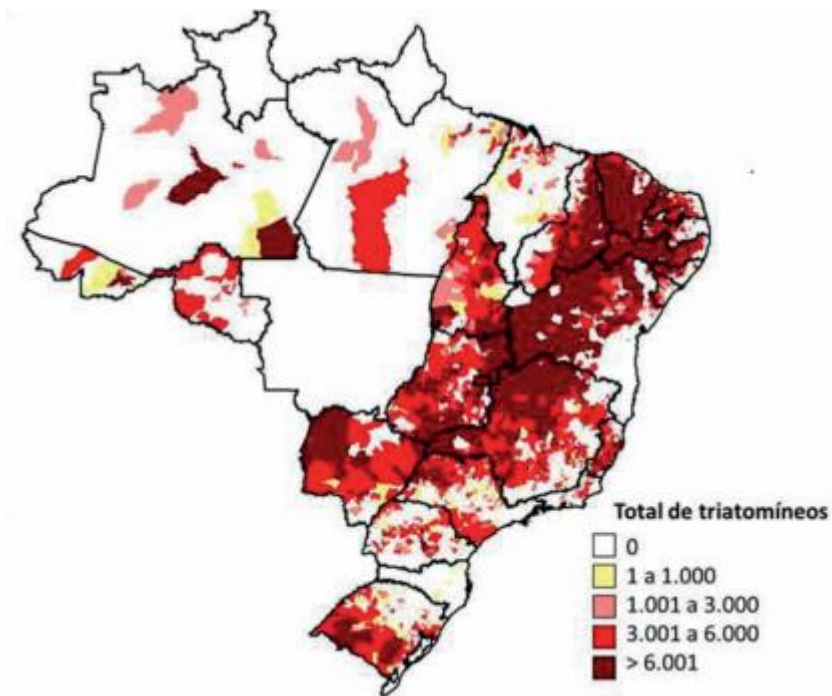


Figura 3- Distribuição quantitativa de triatomíneos capturados nos municípios de 2007 a 2011. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015.

Milhões de indivíduos na América Latina, América do Norte e também em países da Europa foram ou estão sendo afetados pela DC, de acordo com a OMS. Ainda, segunda a mesma, isso ocorre em razão da migração destes indivíduos à procura de melhores condições de vida (FioCruz, 2017). Conseqüentemente, é significativo evidenciar que a DC também retrata um intenso desafio para países não endêmicos por diferentes razões, seja pelo desconhecimento da infecção em meio às populações imigrantes, ou pelo motivo de os serviços de saúde não serem aptos para administrar a mesma (Schmunis, 2007). Com tudo isso, fica evidente que dificuldades existem e, esforços globais se fazem necessários no sentido de adquirir serviços especializados, infraestrutura e mão de obra adequadas para o enfrentamento da DC (Schmunis, 2007; Tanowitz *et al.*, 2011).

1.2.3- Vetores

Sabe-se que o controle vetorial é uma estratégia fundamental para a minimização da transmissão da DC, uma vez que um tratamento terapêutico eficiente apresenta grandes limitações. Os insetos triatomíneos, hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros, pertencentes à ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, são os grandes vetores da doença. Existe um vasto número de espécies desses insetos, entre as quais várias apresentam capacidade de transmissão. No entanto, a principal espécie relacionada à DC no Brasil é o *Triatoma infestans* (**Figura 4**) (FioCruz, 2017).



Figura 4- Morfologia do *Triatoma infestans*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Os triatomíneos são encontrados em vários estados florestais, e no Brasil, de 140 espécies conhecidas, 69 foram identificadas. Originalmente, tatus, gambás e outros roedores que também tinham como habitat ambientes silvestres, eram reservatórios desses insetos. No entanto, eles foram obrigados a migrar para pequenos vilarejos desfavorecidos economicamente em busca por possíveis novos habitats, devido a devastação das matas e erradicação de seus hospedeiros originais. Depois que os insetos já estão em área urbana, mamíferos domésticos como cães e gatos passam a atuar como seus novos reservatórios (Ministério da Saúde, 2009).

Em relação ao controle vetorial, tem-se obtido um avanço considerável. No entanto, tal estratégia não exclui o fato de que ainda existem desafios a serem superados, sejam eles relacionados à capacidade de adaptação dos

triatomíneos as mudanças ambientais e seu monitoramento de resistência aos inseticidas empregados em seu controle (Wanderley *et al.*, 2010, da Silva *et al.*, 2011), como relacionados ao aumento de casos da doença por via oral (FioCruz, 2017).

1.2.4 – Agente Etiológico

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da DC, pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* Kent e gênero *Trypanosoma*. E dentre as características do parasita, observa-se, núcleo, única mitocôndria, cinetoplasto, compartimento localizado na mitocôndria onde contém o material genético do parasita, e flagelo (Telleria *et al.*, 2006). Podendo apresentar 3 formas evolutivas distintas:

Tripomastigota: esta forma evolutiva apresenta formato alongado, com a presença de flagelo vindo da bolsa flagelar na região posterior, que se fixa ao longo do corpo e fica livre na região anterior, apresenta também cinetoplasto localizado na região posterior ao núcleo (**Figura 5**). É considerado a forma infectante do parasita, e pode ser detectado tanto no espaço intercelular dos hospedeiros, quanto no inseto vetor (reto, fração posterior do intestino), no sangue e nas culturas de células infectadas (FioCruz,2017).

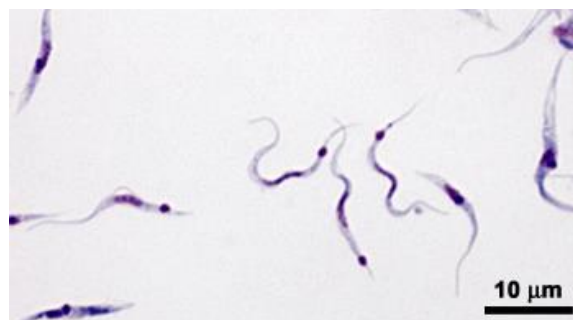


Figura 5- Formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

Amastigota: apresenta formato arredondado, com a presença de um flagelo curto vindo da bolsa flagelar, e cinetoplasto em formato de bastão na porção anterior do núcleo (**Figura 6**). É a forma intracelular do parasita, que pode ser vista em cultivo axênico, ou em células de hospedeiros infectados (FioCruz, 2017).

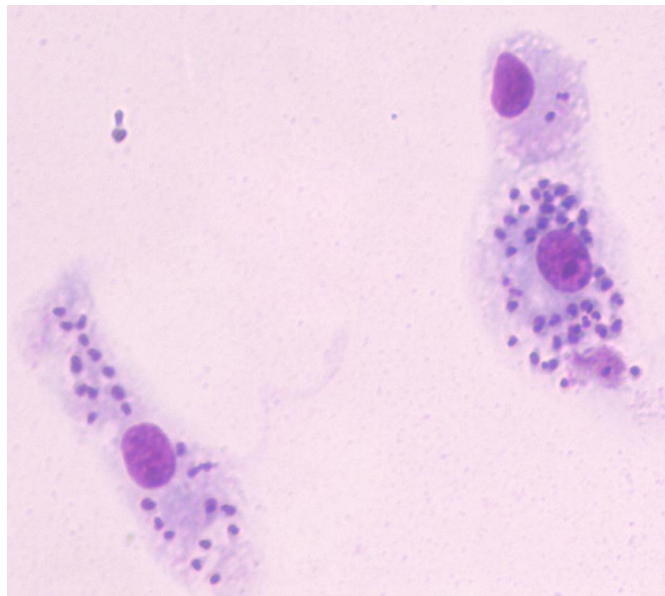


Figura 6 – Formas amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* no interior de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Fonte: Original de Isabela Teresa Santos Corrêa, 2019.

Epimastigota: apresenta formato alongado, com a presença do flagelo vindo da bolsa flagelar e livre na porção anterior. O cinetoplasto é também em formato de bastão, visto anterior ao núcleo (**Figura 7**). Tal forma pode ser detectada no cultivo axênico, ou no tubo digestivo do inseto vetor (FioCruz, 2017).

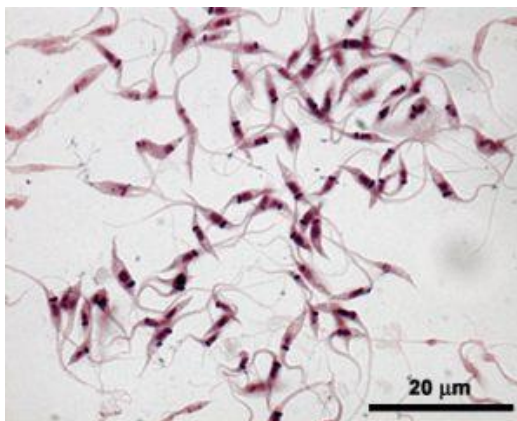


Figura 7 – Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

1.2.5- Ciclo Biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* é caracterizado como sendo um ciclo heteróxico (exibe mais de um hospedeiro), envolvendo quatro estágios morfológicos distintos (tripomastigotas metacíclicos, amastigotas intracelulares, tripomastigotas sanguíneos e epimastigotas) (**Figura 8**) (Tyler & Engman, 2001).

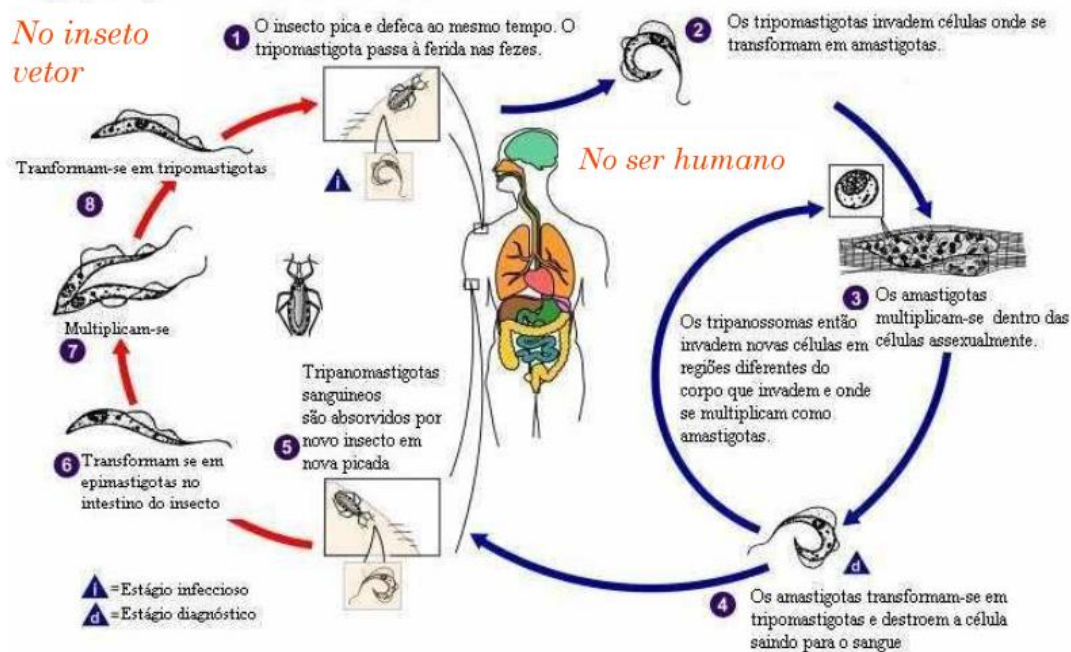


Figura 8- Ciclo de transmissão do *T. cruzi*. Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention, 2019.

A transmissão acontece quando o triatomíneo infectado com *T. cruzi*, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro não-infectado, defeca próximo a picada, devido a pressão do trato digestório, liberando as formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), que por sua vez penetram pela lesão da picada ou por membranas mucosas (Chagas, 1933; Brener *et al.*, 2000), uma vez que, ao coçar a região da picada, o indivíduo desloca o parasita para a circulação sanguínea (Rey, 2001). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* invadem diferentes tipos celulares nucleados, com o recrutamento de lisossomos da célula do hospedeiro. Os lisossomos envolvem o parasita em um vacúolo, os fagolisossomos, que por fim os digerem. As formas tripomastigotas que conseguem escapar para o citosol se diferenciam em amastigotas intracelulares, que se multiplicam e diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, sendo liberados pela célula infectada no sangue, e disseminando a infecção pelo organismo (Burleigh & Andrews, 1995). Com o tripomastigota

sanguíneo liberado no sangue do hospedeiro vertebrado, o triatomíneo se alimenta e ainda em seu organismo acontece a diferenciação em epimastigotas, que se aderem às membranas perimicroviliares das células intestinais, e se multiplicam por divisão binária. Essas formas por sua vez, se transformam nas infectantes tripomastigotas metacíclicas, no intestino posterior do inseto, que se acumulam na parede retal do vetor e são transmitidas ao hospedeiro ao picar e defecar, reiniciando o ciclo (Bonaldo *et al.*, 1988; Tyler & Engman, 2001).

É importante destacar outras crescentes formas de transmissão como a oral, por ingestão de alimentos contaminados por triatomíneos e/ou seus dejetos, transmissão congênita, amamentação e via transfusional, assim como as formas de transmissão excepcionais como, acidentes em laboratório, por transplantes de órgãos, e sexual (Brener *et al.*, 2000; Dias, 2006). Exemplos referente a transmissão da doença foram observados, e dentre eles, mais especificamente sobre a ingestão de alimentos contaminados, têm-se que, em 2005, em Santa Catarina, casos relacionados ao consumo de caldo de cana foram identificados (Stendel *et al.*, 2005), com 24 pessoas infectadas, e três mortes. Já em relação ao consumo de açaí contaminado, notificou-se que no Pará, em 2006, 178 casos foram encontrados, sendo 11 confirmados. E em 2010, na região Amazônica, 17 casos foram comprovados (Souza-Lima *et al.*, 2013).

1.2.6- Patogenia

A DC é caracterizada por diferentes fases, que por sua vez abrangem uma série de sintomas diferentes, seja devido as respostas do hospedeiro, ou a heterogeneidade do parasita (Junqueira *et al.*, 2010). Manifestações neurológicas, cardiomiopatia e/ou megassindromes digestivas se desenvolvem em 30% a 40% dos atingidos (Rassi *et al.*, 2010).

As etapas principais da doença são conhecidas como aguda e crônica, e o período de incubação do *T. cruzi* pode variar de 3 a 112 dias, dependendo do modo de infecção (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

1.2.6.1- Fase Aguda

A fase aguda é geralmente assintomática ou oligossintomática, tem a duração de 4 a 8 semanas, e uma característica predominante nesta fase é a presença do parasita circulante na corrente sanguínea. Foi evidenciado que tal infecção nesta fase aguda pode sim estar associada a sintomas como anemia, hipoplasia da medula óssea, trombocitopenia e leucopenia (Pereira & Navarro, 2013). Assim como febre prolongada, mal-estar, hepato e/ou esplenomegalia e linfadenomegalia na região da picada (sinal de Romanã ou chagoma de inoculação) também são observados (Rassi *et al.*, 2010) (**Figura 9**).

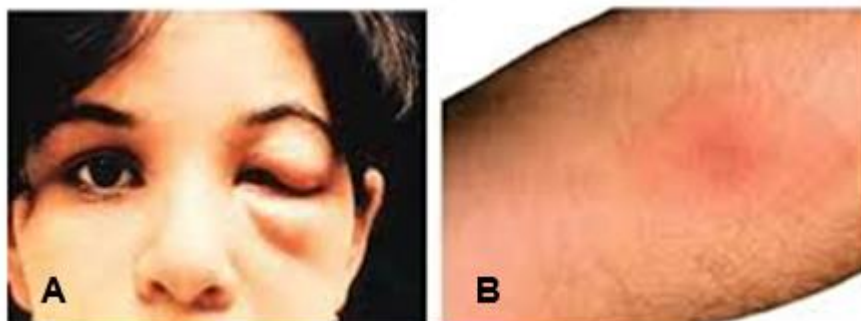


Figura 9- Pacientes apresentando sintomas referente a doença de Chagas aguda. A- sinal de Romanã, B- chagoma de inoculação cutânea. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Ainda em relação a fase aguda da doença, de 2005 a 2009 foram identificados 455 casos no Brasil, sendo 389 (85,5%) na região norte do país, 310 (68,1%) no Pará e 29 (6,3%) no estado do Amazonas (Monteiro *et al.*, 2010), com taxa de mortalidade variando de 5 a 10%, envolvendo crianças que geralmente morrem de miocardite e/ou mieloencefalite (Murcia *et al.*, 2013).

1.2.6.2- Fase Crônica

Já a fase crônica da doença, se caracteriza pela baixa incidência de parasitas circulantes na corrente sanguínea e pode se manifestar nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. Aproximadamente 60% dos pacientes não manifestam sintomatologia significativa do panorama clínico durante o período crônico, nem resultados incomuns no eletrocardiograma (ECG), no estudo radiológico de tórax, esôfago e cólon, os quais são indicados como o mais promissor prognóstico clínico para os pacientes nessa circunstância, dado que não há engajamento cardíaco ou digestivo, sendo capaz de perdurar muitos anos (Soares-Sobrinho *et al.*, 2007; Pereira e Navarro, 2013). Tal caso é determinado pela forma indeterminada da doença.

Porém, cerca de 40% dos pacientes progridem para a condição cardíaca e/ou digestiva (Soares-Sobrinho *et al.*, 2007; Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Na maior parte dos casos a forma cardíaca está presente, a qual é caracterizada por infiltrado inflamatório, morte celular e fibrose intersticial que ocasionam em distúrbios do sistema de condução cardíaco, arritmia ventricular e miocardite, além de distúrbios microvasculares que podem suceder em morte súbita (Coura, 2009).

Já a forma digestiva refere-se à menor parte dos casos, aproximadamente 10%, e normalmente tem como desfecho a dilatação do trato gastrointestinal, que constantemente progride para mega cólon (constipação crônica, dor abdominal e obstrução) ou megaesôfago (disfagia, dor no peito e regurgitação) (Lescure *et al.*, 2010). O megaesôfago no que lhe concerne é capaz de estar ligado às variações no trânsito intestinal, que se torna cada vez mais devagar, levando a hipertrofia muscular e em casos mais intensificados, a dilatação do órgão (Rey, 2008).

1.2.7 – Tratamento

O tratamento da DC ainda é um desafio, uma vez que os medicamentos utilizados na clínica apresentam elevada taxa de falha

terapêutica, como o alto nível de toxicidade e longos períodos de tratamento.

Atualmente, a quimioterapia da DC compreende apenas dois fármacos: benznidazol e nifurtimox, sendo apenas o benznidazol aprovado para uso no Brasil (Soares-Sobrinho *et al.*, 2007, Bahia *et al.*, 2012).

1.2.7.1 – Nifurtimox

O derivado nitrofurânico nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), comercializado como Lampit® (não utilizado no Brasil), exibe atividade tanto contra as formas tripomastigotas, quanto contra amastigotas intracelulares (Coura *et al.*, 2002). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da capacidade do *T. cruzi* em eliminar radicais livres através da geração de um nitro-ânion na presença de oxigênio (Apt & Zulantay, 2011) (**Figura 10**).

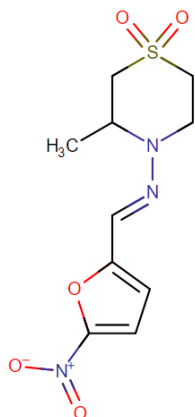


Figura 10- Estrutura química do nifurtimox. Fonte: Drugbank, 2020.

No Brasil, a partir da década de 80, em consequência dos efeitos colaterais, como anorexia, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência, perda de peso, e complicações digestivas (náuseas, cólicas intestinais e diarréia) o medicamento teve sua venda suspensa (Soares Sobrinho *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Marin-Neto *et al.*, 2009).

1.2.7.2- Benznidazol

O benznidazol por sua vez, age inibindo a síntese de proteínas e de RNA tanto das formas extracelulares quanto intracelulares, provocando a degradação de macromoléculas (Maya *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). O fármaco é um nitroimidazol, que se apresentou mais decisivo e confiável que o nifurtimox contra formas tripomastigotas do parasita (Coura *et al.*, 2002) (**Figura 11**).

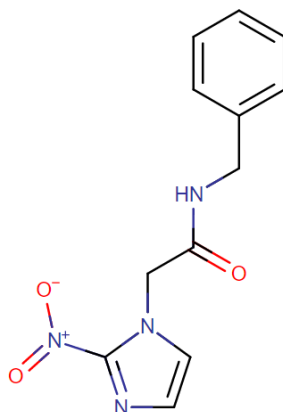


Figura 11- Estrutura química do benznidazol. Fonte: DruBank, 2020.

A farmacocinética avaliada em modelo experimental do fármaco benznidazol sugere quase total biodisponibilidade quando administrado por via oral, com meia-vida plasmática variando de 2-2,5 horas (Perin *et al.*, 2017). Após a absorção, o fármaco se distribui amplamente nos tecidos, incluindo o tecido da placenta e do feto, em níveis semelhantes aos do sangue circulante. E em relação às vias metabólicas e de excreção não há dados elucidados (FDA, 2016).

Por sua vez, o perfil farmacológico e toxicológico não clínico do benznidazol aborda preocupações que incluem efeito como carcinogenicidade, teratogenicidade, efeitos na fertilidade masculina, gravidez feminina e genotoxicidade (mutagenicidade e clastogenicidade positivas) (de Toranzo *et al.*, 1984; Gorla & Castro, 1985; Ferreira *et al.*, 1986; Teixeira *et al.*, 1994). Tais efeitos podem ser parcialmente impulsionados por espécies reativas de

oxigênio decorrentes da redução do grupo nitro a um grupo amino que estão presentes em organismos de mamíferos (Campos *et al.*, 2014).

No período de 2004 a 2011, foi conduzido um amplo estudo clínico (BENEFIT) para avaliação da eficácia do benznidazol em cinco países com 2.854 pacientes. Neste estudo concluiu-se que apesar de efetivo na fase aguda da doença, reduzindo a parasitemia, o benznidazol não previne danos cardíacos (Morillo *et al.*, 2015).

Frente à problemática aqui apresentada, a DC conta com um arsenal terapêutico extremamente limitado, falho e altamente tóxico, sendo assim a introdução de novas terapias para esta doença é essencial.

1.3 Pesquisa de Novas Quimioterapias

Universidades e institutos de pesquisa têm empregado esforços para o desenvolvimento de novas terapias para doenças negligenciadas.

Considerando toda problemática já abordada, estudos mostram promissores resultados para DC, relacionando derivados do triazol (inibidores da biossíntese do ergosterol), como ravuconazol (Lescure *et al.*, 2010), amidinas (Soeiro *et al.*, 2013), azóis (Buckner *et al.*, 2012), amiodaronas (Veiga-Santos *et al.*, 2012), derivados da naftoquinona naturais e megazóis (Soeiro *et al.*, 2011), bem como bloqueadores de canais de cálcio (Reimão *et al.*, 2011). Porém, clinicamente compostos eficazes ainda permanecem indescritíveis.

A partir disso, o *Drugs for Neglected Disease initiative* (DNDi) advertiu sobre a importância da busca urgente por novas terapias (Pecoul *et al.*, 2016), e apesar dos avanços na identificação de novos candidatos a fármacos contra a doença, a proposta terapêutica manteve-se a mesma e até hoje não existe nenhum tratamento eficaz para os pacientes em fase crônica (Pereira & Navarro, 2013).

1.3.1- Reposicionamento de Fármacos

O reposicionamento de fármacos é a estratégia que visa encontrar um novo uso para um fármaco já aprovado ou que teve sua pesquisa descontinuada. Tal estratégia está se tornando cada vez mais aplicável no setor público-privado, uma vez que busca diminuir o tempo e custo na pesquisa e desenvolvimento de fármacos (O'Connor & Roth, 2005).

O reposicionamento engloba diferentes opções tecnológicas existentes, e dentre elas a combinação de fármacos, novas indicações e formas terapêuticas, novas posologias e vias de administração. Tecnologias essas que vêm sendo bastante utilizadas, uma vez que o desenvolvimento de um produto farmacêutico não se encontra apenas em meio a descoberta de um novo composto, mas também ao estudo de moléculas existentes (Padhy & Gupta, 2011). Sabe-se que a descoberta de um novo composto está atrelada ao ineditismo, elevados investimentos e longo período de pesquisa, mas o estudo de moléculas existentes permite além de menor custo e tempo de pesquisa, a modificação ou expansão do ciclo de vida de medicamentos já consolidados no mercado (Padhy & Gupta, 2011).

Em geral, cada vez mais fármacos estão sendo reposicionados para os mais diversos fins (**Tabela 1**). Já em relação às doenças negligenciadas, estudos recentes publicados por nosso grupo têm demonstrado a potencial aplicação de diferentes fármacos na terapêutica dessas doenças.

Tabela 1- Lista de fármacos reposicionados e ano de aprovação (Novac, 2013).

Fármaco	Indicação Original	Indicação de Reposicionamento	Ano*
Anfetamina	Estimulante	Hipercinesia em crianças (transtorno do déficit de atenção com hiperatividade TDAH)	1943
Alopurinol	Síndrome de lise tumoral	Gota	1967
Zidovudina	Câncer	HIV/AIDS	1985
Minoxidil	Hipertensão	Alopecia	1988
Bupropiona	Depressão	Tabagismo	1997
Sibutramina	Depressão	Obesidade	1997
Finasterida	Hiperplasia benigna da próstata	Alopecia	1997
Metotrexato	Câncer	Artrite reumatoide	1999
Fluoxetina	Depressão	Transtorno disfórico pré-menstrual	2000
Atomoxetina	Mal de Parkinson	Déficit de atenção e hiperatividade	2002
Talidomida	Enjoo matinal	Mieloma múltiplo	2003
Cymbalta	Depressão	Neuropatia periférica diabética	2004
Topiramato	Epilepsia	Enxaqueca	2004
Paclitaxel	Câncer	Reestenose	2004
Sildenafil	Angina	Disfunção erétil	2005
Lumigan	Glaucoma	Hipotricose simples	2009
Dapoxetine	Analgesia e depressão	Ejaculação precoce	2009
Fentolamina	Hipertensão	Revertor anestésico dental	2009
Lidocaína	Anestesia local	Arritmia	2010
Mifepristone	Interrupção da gravidez	Síndrome de Cushing	2012

*Ano da primeira aprovação nas novas indicações

Observa-se que alguns bloqueadores de canais de cálcio (BCC) têm demonstrado atividade antiprotozoária, com interferência na mitocôndria única de parasitas *Leishmania*. A nimodipina, um BCC, indicado para prevenir e tratar danos causados por isquemia cerebral, apresentou atividade contra

promastigota e amastigotas de *Leishmania*, com CE_{50} de 81,2 e 21,5 μM respectivamente, causando tanto dano mitocondrial quanto na membrana plasmática (Tempone *et al.*, 2007). Outro fármaco BCC, o bepridil, usado como agente anti-hipertensivo, demonstrou atividade contra promastigota e amastigotas de *Leishmania*, com CE_{50} de 3,81 e 21,55 μM respectivamente (Reimão *et al.*, 2011). Esses fármacos mostraram-se como potenciais candidatos a agentes antileishmania, podendo ser explorados como compostos líderes e protótipos de fármacos, ressaltando ainda mais a necessidade de avaliação tanto de outros fármacos BCC, quanto outras patologias causadas por diferentes tripanossomatídeos, como a DC.

1.3.1.1 Manidipino

Os fármacos BCC, particularmente os agentes do grupo 1,4-dihidropiridina, exibem eficácia e segurança anti-hipertensivas, além de demonstrarem uma redução na morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Kostis, 2003).

Manidipino (**Figura 12**), um BCC, derivado do grupo 1,4-dihidropiridina, de terceira geração, é um medicamento anti-hipertensivo eficaz e bem tolerado para hipertensão leve a moderada, em pacientes hipertensos e com comorbidades, como diabetes mellitus tipo 2 e / ou insuficiência renal (Kostis, 2003). O fármaco dilata arteríolas renais eferentes e aferentes, demonstrando efeitos renais benéficos não relacionados ao efeito anti-hipertensivo (McKeage, 2004).

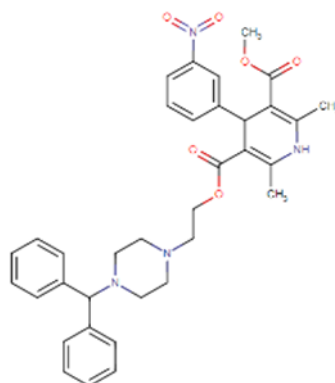


Figura 12- Estrutura química do fármaco manidipino. Fonte: DrugBank, 2020.

Em relação às propriedades farmacológicas, o fármaco manidipino, inibe os canais de cálcio dos tipos L (de longa ação da corrente elétrica produzida pela entrada de cálcio para dentro da célula) e T (caracterizado pela corrente elétrica transitória e de menor voltagem) nas células do músculo liso, resultando em vasodilatação periférica e pressão arterial reduzida (Watanabe, 2003).

Estudos mostram que em pacientes hipertensos, o início da inibição do fluxo de cálcio é gradual e mantido por longos períodos, com efeitos de 24 horas de intervalo (McKeage, 2004). É altamente seletivo para a vasculatura e possui ação cardiodepressora desprezível (Kostis, 2003). Também em pacientes hipertensos, seu uso com dosagens recomendadas não rendeu efeito clinicamente relevante na frequência cardíaca ou nos parâmetros eletrocardiográficos. Além de não ter afetado significativamente a norepinefrina, que sugere falta de ativação simpática (McKeage, 2004).

1.4- Estudo de Mecanismo de Ação

Independente da estratégia utilizada para o surgimento de novas quimioterapias, a compreensão do mecanismo de ação se faz extremamente necessária, seja para identificação de novos alvos terapêuticos, ou para a otimização da potência e seletividade, além da exclusão de possíveis efeitos adversos (Schenone *et al.*, 2013; Katsuno *et al.*, 2015). Portanto, para que tais estudos sejam possíveis, destacam-se como pontos principais tanto o

conhecimento relacionado a biologia do parasita, quanto a identificação das organelas (alvos) que podem ser afetadas.

1.4.1- Membrana Plasmática

A membrana plasmática vem se tornando um importante alvo potencial para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para tripanossomatídeos, posto que uma inibição no gradiente de prótons e consequente formação de poros transmembranais, além da modificação da sua permeabilidade, afetam diretamente o transporte ativo de metabólitos, apresentando então função vital ao hospedeiro (Morth *et al.*, 2011; Marr *et al.*, 2012).

Desempenhando um importante papel na separação entre ambos os ambientes extracelular e intracelular, a membrana plasmática atua de forma altamente seletiva e específica, interligando tais compartimentos de maneira bastante funcional (FioCruz, 2017). Alguns nutrientes externos e sinais essenciais para a proliferação e atividade celular são internalizados através de canais e transportadores, o que gera grandes gradientes eletroquímicos que levam a formação de um potencial negativo no interior da membrana plasmática. De acordo com o movimento de íons através da membrana, esse potencial é alterado e um desequilíbrio iônico pode levar as células a morte (Franco *et al.*, 2006; Morth *et al.*, 2011; Venkatesh *et al.*, 2017).

Tripanossomatídeos como *T.cruzi* apresentam na membrana plasmática uma bicamada lipídica, onde distintas proteínas associam-se em diferentes graus (FioCruz, 2017). É composta por diversos glicoconjugados (glicoproteínas, glicolipídeos e lipofosfoglicanos), que por sua vez, são cobertos por um glicocálice delgado. É importante mencionar que diversas dessas moléculas de superfície estão envolvidas no processo de interação do protozoário com a célula hospedeira, visto que a maioria desses glicoconjugados são ligados à membrana por âncoras glicosilfosfatidilinositol (Morth *et al.*, 2011).

1.4.2- Mitocôndria

Os tripanossomatídeos são caracterizados por apresentar uma mitocôndria única e ramificada, que se estende por todo o corpo celular do parasita. Denominam-se pela classe de *Kinetoplastea* devido a presença de cinetoplasto, uma região específica da mitocôndria onde está concentrado o DNA mitocondrial, que por sua vez é formado por extensa rede de moléculas circulares interligadas, representando cerca de 30% do DNA total dos tripanosomatídeos (FioCruz, 2017).

A mitocôndria (**Figura 13**) exhibe paralelamente uma membrana externa, constituída por uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol e uma membrana interna, composta pelas cristas mitocondriais que são pequenas porções invaginadas para o interior da matriz, onde estão localizados o sistema de elétrons e os transportadores. Por sua vez, é na matriz mitocondrial que estão localizadas as enzimas metabólicas e o material genético, situado no cinetoplasto (Heller *et al.*, 2012).

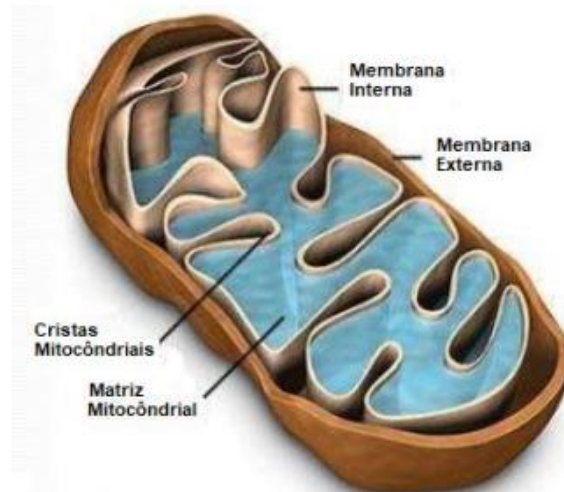


Figura 13 - Esquema ilustrativo estrutural da mitocôndria. Fonte: Original de LHSC, 2012.

Justamente por ser única em tripanossomatídeos, a mitocôndria vem se tornando um importante alvo terapêutico com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre suas características podemos destacar sua importância como o principal local de geração de energia química, sendo

responsável pela maior parte da produção de Adenosina Trifosfato (ATP) que a célula necessita (Menna-Barreto & Castro, 2014).

A mitocôndria apresenta também algumas importantes propriedades a serem apontadas. Ainda baseado na produção de ATP, produzido pela membrana interna, (onde são encontrados os complexos da cadeia respiratória, através de um processo baseado na transferência de elétrons com extrusão de prótons de hidrogênio (H^+) meio ao espaço intramembranar), há a geração de um potencial elétrico. Tal potencial elétrico é basicamente a diferença de potencial elétrico que existe entre os meios intra e extracelular, essencial para manter o funcionamento da cadeia respiratória e a síntese de ATP, além do controle dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da homeostase de Ca^{+2} intracelular (Perry *et al.*, 2011).

Em relação às espécies reativas de oxigênio (EROs), sua principal produção acontece durante a respiração mitocondrial, a partir da redução de oxigênio. Espécies como ânion superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) fazem parte dos processos metabólicos normais em todos os organismos aeróbios, logo, a mitocôndria exibe importante fonte intracelular de EROs, uma vez que do total de O_2 consumido, de 1 a 2% acabam resultando na formação de tais espécies (Lejay *et al.*, 2012). As espécies mencionadas podem desempenhar papéis que envolvem sinalização ou citotoxicidade, mas quando seus níveis excedem a capacidade de neutralização dos sistemas antioxidantes, há um desequilíbrio denominado estresse oxidativo, que permite gerar interferência nas vias metabólicas e consequente morte do parasita (Sies, 2014).

Por fim, em relação ao Ca^{2+} intramitocondrial, sabe-se que ele é o gradiente eletroquímico envolvido na ativação de enzimas-chave, processos metabólicos (atividade cardíaca, coagulação do sangue, manutenção das membranas celulares, adesão celular, transmissão de sinais às células nervosas, contração muscular), e na regulação de funções musculares e nervosas (Lejay *et al.*, 2012). No entanto, uma perturbação na concentração

intracelular deste íon, e a exposição prolongada das células a altas concentrações de Ca^{2+} podem causar danos pela ativação de diversas vias que sinalizam para a morte celular. Com o aumento no nível de Ca^{2+} citosólico, a mitocôndria tende a aumentar a sua captação, funcionando como um sistema tampão. Tal sistema por sua vez apresenta certa limitação devido a formação de canais de alta condutância, devido justamente a este aumento de Ca^{2+} acima de certos limites. Os canais atravessam as membranas mitocondriais, acarretando a dissipação do potencial elétrico (Orrenius *et al.*, 2003; Benaim & Garcia, 2011).

1.5- Bloqueadores de Canais de Cálcio

Ca^{2+} tem sido amplamente reconhecido como um elemento essencial em todos os eucariotos (Benaim, 1996; Garcia *et al.*, 2008). Nos tripanossomatídeos, a regulação de Ca^{2+} intracelular envolve três organelas intracelulares: o retículo endoplasmático, a mitocôndria e os acidocalcissomos, sendo a mitocôndria e os acidocalcissomos também os responsáveis pela bioenergética do parasita (Patel & Docampo, 2010; Huang *et al.*, 2014).

Atuando em conjunto sempre que ocorre uma alteração da concentração de cálcio, tais organelas são necessárias para a retomada da concentração ao nível basal citoplasmático. Assim, esses mecanismos de regulação, localizados na membrana plasmática, são responsáveis pela regulação a longo prazo da concentração de cálcio (**Figura 14**) (Benaim & Garcia, 2011).

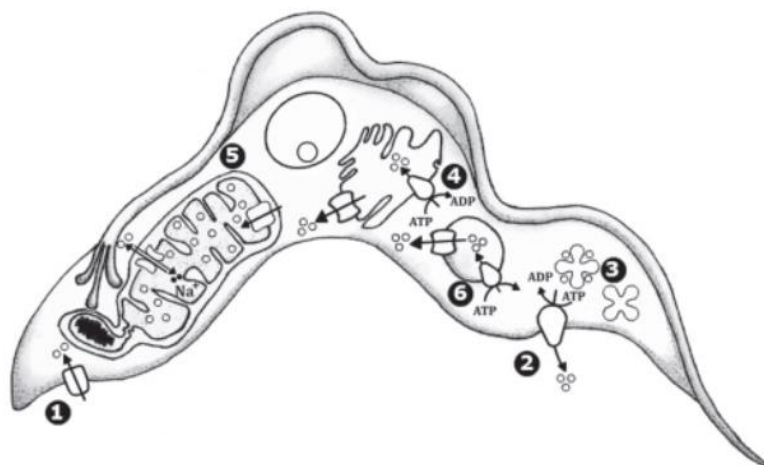


Figura 14- Modelo esquemático da regulação de Ca^{2+} em tripanossomatídeos.

O Ca^{2+} entra na célula através de um canal não identificado (1) e é expulso para fora da célula por uma bomba na membrana plasmática (PMCA) (2), que é estimulada pela calmodulina (3). No interior da célula, o Ca^{2+} pode ser sequestrado pelo retículo endoplasmático através de uma bomba de Ca-ATPase reticular (4), deixando essa organela por um canal de Ca^{2+} também não identificado. A mitocôndria (5) pode transportar Ca^{2+} com baixa afinidade, por um Ca^{2+} uniporter mitocondrial, energizado pelo potencial eletroquímico H^+ . O Ca^{2+} intramitocondrial pode ser administrado ao citosol por um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (ou $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$). E finalmente, os acidocalcissomos (6) podem acumular grandes quantidades de Ca^{2+} pelo PMCA, facilitado pela grande quantidade de polifosfatos dentro desta organela. Fonte: Benaim & Garcia, 2011.

A interrupção da homeostase do Ca^{2+} em qualquer célula, inclusive de tripanossomatídeos humanos, como o *T. cruzi*, geralmente leva a efeitos letais, resultando em morte celular por apoptose ou necrose (Zhivotovsky & Orrenius, 2011), seja tal interrupção referente a qualquer processo visto.

Por meio de interrupções como a inibição seletiva da entrada de cálcio através da membrana celular, ou a liberação de cálcio em reservatórios intracelulares, constituem os fármacos da classe bloqueadores de canais de cálcio (BCC). Tais fármacos são bastante utilizados no tratamento da hipertensão e espasmos cerebrovasculares, como agentes protetores do miocárdio e no relaxamento de espasmos uterinos (Abernethy & Schwartz,

1999), justamente por serem indutores do relaxamento do músculo liso vascular. Essa classe de fármacos compõe três distintas famílias: os derivados das 1,4-diidropiridinas (como anlodipino, nifedipino, lacidipino e o fármaco estudado manidipino), os benzotiazepínicos (como diltiazem), e as fenilacrilamidas (como verapamil) (Motro *et al.*, 2001).

Alguns fármacos da classe BCC vêm sendo considerados candidatos com elevado potencial antiparasitário. Estudos de Misra *et al.*, 1991, mostram que exemplos como nifedipino e verapamil desenvolveram um papel importante do cálcio durante a infecção de novos macrófagos por *L. (L.) donovani*, bloqueando a ligação de amastigotas aos macrófagos previamente tratados. Do mesmo modo, Palit & Ali, 2008, relataram atividade *in vitro* e *in vivo* de derivados das 1,4-diidropiridinas anlodipino e lacidipino contra *L. (L.) donovani*.

1.6- JUSTIFICATIVA

Doenças negligenciadas não são consideradas lucrativas para indústrias farmacêuticas, já que o potencial de retorno financeiro é reduzido. Considerando as limitações terapêuticas referente à DC, a busca por novas terapias se torna de extrema importância. Por meio do reposicionamento de fármacos, o anti-hipertensivo manidipino foi investigado quanto a sua ação contra o anti-*Trypanosoma cruzi*, visando à obtenção de um futuro candidato aos estudos pré-clínicos.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos Gerais:

Estudar a atividade anti-*T. cruzi* do bloqueador de canal de cálcio manidipino em modelo *in vitro*, nas formas extracelulares e intracelulares do parasita, bem como seu mecanismo de ação.

2.2- Objetivos Específicos:

- 1- Determinar a concentração efetiva 50% *in vitro* do fármaco por meio de ensaios fenotípicos, utilizando tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.
- 2- Avaliar por meio de ensaios de citotoxicidade em células de mamífero, o índice de seletividade do fármaco.
- 3- Avaliar alterações da membrana plasmática causadas pelo fármaco, por meio de técnicas espectrofluorimétricas.
 - 3.1 Avaliação da Permeabilidade da Membrana Plasmática
 - 3.2 Avaliação do Potencial de Membrana Plasmática
- 4- Avaliar alterações bioenergéticas do *T. cruzi* por meio de citometria de fluxo e técnicas espectroluminescentes.
 - 4.1 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial
 - 4.2 Avaliação dos níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)
 - 4.3 Avaliação dos níveis de Espécie Reativa de Oxigênio (EROs)

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Reagentes e Fármacos

Os fármacos manidipino (5-O- [2- (4-benzidrilpiperazin-1-il) etil] 3-O-metil 2,6-dimetil-4- (3-nitrofenil) -1,4-di-hidropiridina-3,5 -dicarboxilato), benznidazol, os reagentes resazurina e MTT [3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo] foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Brasil. Reagentes como Sytox® Green, ácido bis- (1,3-dimetil tiobarbitúrico) trimetil oxonol (Bisoxonol), diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA), iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', A 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1) e o kit de determinação de ATP 200-1.0 foram adquiridos pela Thermo Fisher-Invitrogen™ (Brasil). Outros reagentes não mencionados foram adquiridos na Sigma (Brasil).

3.2- Animais de Experimentação

Camundongos BALB / c foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos com água e alimento *ad libitum* para obtenção de macrófagos peritoneais e, para manutenção de *T. cruzi*. Os procedimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CTC IAL 72J / 2017).

3.3- Parasitas e Células

Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidos em células renais de macaco Rhesus (LLC-MK2 - ATCC CCL 7), utilizando meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) 2%, em incubadora de CO₂ 5%, a 37°C (Kesper *et al.*, 2000). As células conjuntivas murinas (clone NCTC 929, ATCC), LLC-MK2 e macrófagos (obtidos da cavidade peritoneal) foram mantidas em RPMI-1640 suplementado com SFB 10%, em incubadora de CO₂ 5%, a 37°C (Wulsten *et al.*, 2017).

3.4- Estudos de Eficácia *in vitro*

A Concentração efetiva 50% (CE₅₀) foi avaliada tanto em amastigotas intracelulares quanto em formas extracelulares (tripomastigotas) de *T. cruzi*. Todos os experimentos realizados utilizaram o fármaco benznidazol como o fármaco padrão, e células não tratadas como controle negativo (100% viabilidade).

3.4.1- Amastigotas Intracelulares

A atividade anti-amastigota foi realizada em macrófagos infectados com *T. cruzi*, previamente obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB / c. Os macrófagos (1x10⁵ células/poço) foram adicionados em lâmina de 16 poços (placa NUNC, Merck; 1x10⁵/poço) e incubados por 24 h em incubadora de CO₂ 5%, a 37°C. Os macrófagos foram infectados com tripomastigotas, obtidos de culturas LLC-MK2 previamente infectadas, (proporção parasita: macrófago = 10:1), e após 2 h de incubação, os parasitas não internacionalizados foram removidos por lavagem com RPMI-1640. O fármaco manidipino foi então incubado juntamente com os macrófagos infectados por 48 horas, em faixa de concentração de 20 a 0,07 µM, a 37°C. O benznidazol (20 a 0,07 µM) foi utilizado como fármaco padrão (Reimão *et al.*, 2011). Ao término do ensaio as lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Para determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀), foi utilizado o índice de infecção (IF), obtido através da contagem diferencial de 200 macrófagos/poço e calculado pela seguinte fórmula descrita abaixo (Chang *et al.*, 1986).:

$$\text{IF} = \frac{\text{Macrófagos Infectados} \times \text{Amastigotas Intracelulares}}{\text{Macrófagos Totais}}$$

As imagens das lâminas coradas foram adquiridas em um microscópio óptico digital (EVOS M5000, Thermofisher).

3.4.2- Tripomastigotas

Para avaliação da atividade anti-tripomastigota, o fármaco manidipino foi incubado em meio RPMI-1640, a uma faixa de concentração de 150 - 0,05 μ M, juntamente com as formas tripomastigotas (1×10^6 /poço) por 24 horas em incubadora de CO₂ 5%, a 37°C. O benznidazol foi usado como fármaco padrão (150 a 0,05 μ M). A viabilidade dos tripomastigotas foi avaliada pelo método colorimétrico da resazurina (Reimão *et al.*, 2011) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5 Multi-Mode) com absorvância a 570 nm.

3.5- Determinação da Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando as células NCTC (clone -L929). As células (6×10^4 células/poço) foram incubadas em meio RPMI-1640 com SFB 10%, juntamente com o fármaco manidipino (200 - 1,56 μ M) por 48 h em incubadora de CO₂ 5%, a 37°C. A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT (Tada *et al.*, 1986), e a leitura foi realizada no espectrofotômetro FilterMax F5 Multi-Mode a 570 nm.

3.6- Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) e a Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) estabelecida nos parasitas (Reimão *et al.*, 2011).

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ em células de mamífero}}{CE_{50} \text{ em amastigotas intracelulares}}$$

3.7- Estudos do Mecanismo de Ação.

Para definir os parâmetros de tempo e concentração ideais para os estudos de mecanismo de ação, foi realizado um ensaio de

concentração efetiva 50% (CE₅₀). Desta forma, tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (2x10⁶ células/poço) foram incubados com o fármaco diluído (100 a 0,1 µM) por até 4 horas em meio HBSS suplementado com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), a 37°C. Após o período de incubação, a morfologia celular foi avaliada visualmente em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e a viabilidade celular foi determinada utilizando o método da resazurina (Reimão *et al.*, 2011). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5Multi-Mode), com comprimento de onda de 570 nm.

3.7.1- Alteração da Permeabilidade da Membrana Plasmática

Para a avaliação de possíveis alterações na permeabilidade da membrana plasmática do *T. cruzi*, foi utilizado o marcador fluorescente de ácidos nucleicos, Sytox® Green. O marcador é impermeável a células viáveis, e quando a membrana plasmática das células é comprometida, o fluoróforo consegue penetrar facilmente (Johnson & Spence, 2010). Desta forma, o aumento da fluorescência está ligado à quantidade de fluoróforo que se liga aos ácidos nucleicos, e pode ser diretamente relacionada ao aumento da permeabilidade celular.

A avaliação da permeabilidade da membrana plasmática foi realizada em tripomastigotas de *T. cruzi* (2 x 10⁶/poço). Os parasitas foram incubados em meio HBSS suplementado com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), juntamente com o fármaco manidipino (na concentração de CE₅₀), seguido pela sonda Sytox Green (1 µM). Posterior a leitura basal, a fluorescência foi mensurada a cada 20 minutos durante até 2 horas (120 min) (Chicharro *et al.*, 2001). Como controle positivo, Triton X-100 a 0,5% foi utilizado para a permeabilização máxima da membrana; e como controle negativo, foram utilizados tripomastigotas não tratados (Kulkarni *et al.*, 2009). A leitura foi realizada no leitor de microplacas fluorimétrico FilterMax F5Multi-Mode, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 520 nm, respectivamente. Para verificar a possível ocorrência de interferências na

fluorescência, controles contendo apenas o fármaco e o fluoróforo foram adicionados.

3.7.2- Alteração do Potencial da Membrana Plasmática ($\Delta\Psi_p$)

Para possíveis alterações no potencial da membrana plasmática, foi estudada a técnica que envolve o uso do marcador fluorescente bisoxonol (ácido bis 1,3-dietil tiobarbitúrico trimetina-oxonol [DiSBAC2 (3)]). Por ser um fluoróforo aniônico e sensível ao potencial, sua entrada no meio intracelular é impedida pelo potencial negativo da membrana plasmática. Uma vez que uma despolarização acontece (diminuição no potencial), mais fluoróforo consegue entrar e se ligar a proteínas ou membranas intracelulares, aumentando a fluorescência. Por outro lado, quando as células estão hiperpolarizadas (com potencial aumentado), o fluoróforo é excluído da mesma e uma diminuição da fluorescência acontece, resultado da diminuição da concentração intracelular. Sendo assim, o aumento e a diminuição da fluorescência estão diretamente relacionados a despolarização e hiperpolarização da membrana plasmática, respectivamente (Johnson & Spence, 2010).

Para esta análise, tripomastigotas (2×10^6 /poço) foram incubados em meio HBSS suplementado NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), juntamente com o fármaco manidipino (em concentração de CE_{50}) por 1 e 2h a 37°C . Uma lavagem foi realizada e posteriormente foi acrescentado a sonda DiSBAC2 (3) (0,2 μM) e incubado novamente a 37°C por 10 min (Luque-Ortega & Rivas, 2010). Como controle positivo, foi utilizada a gramicidina D (0,5 mg/mL), a fim de exibir polarização máxima, e como controle negativo, foi utilizado tripomastigotas não tratados. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) (Londero *et al.*, 2018).

3.7.3- Alteração do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado um marcador potencial dependente, que se acumula na mitocôndria, e

cujo espectro de emissão varia entre verde (530 nm) e vermelho (590 nm), o JC-1. Ele aparece tanto na forma de monômeros, em baixas concentrações (exibindo fluorescência verde), quanto na forma de J-agregados, em altas concentrações (exibindo fluorescência vermelha). Então, considerando que a formação de J-agregados aumenta linearmente com o potencial da membrana mitocondrial, a despolarização pode ser analisada pela diminuição da razão de fluorescência vermelha/verde (Cossarizza *et al.*, 1993; Johnson e Spence, 2010).

Nesta análise, tripomastigotas (2×10^6 /poço) foram tratados por até 4 h de incubação em meio HBSS suplementado com NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), juntamente com o fármaco manidipino (em concentração de CE_{50}). Uma lavagem foi realizada, e posteriormente foram suspensos com o corante lipofílico catiônico JC-1 (10 μM) e incubado por 10 min a 37 °C. Em seguida foi realizada nova lavagem dos parasitas para eliminar o corante não internalizado. Como controle positivo, 100 μM de 3-clorofenil-hidrazona de cianeto de carbonila (CCCP) foram utilizados para despolarização máxima, e como controle negativo, foram adicionados tripomastigotas não tratados. A análise foi realizada por citometria de fluxo (citômetro de fluxo Attune NxT - ThermoFisher) e foi calculada a razão entre as intensidades de fluorescência vermelho/verde (BL-2/BL-1; 590 nm/530 nm) (Mukherjee *et al.*, 2002).

3.7.4- Alteração nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para possíveis alterações nos níveis de EROs, foi utilizado o H_2DCFDA , um marcador não fluorescente, permeável a células. Esse componente não fluorescente é convertido para a forma fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), após a clivagem de seus grupos acetato por esterases intracelulares e por meio de oxidação (**Figura 15**) (LeBel *et al.*, 1992).

A utilização deste marcador torna então possível a observação de alterações celulares na produção de EROs (Johnson e Spence, 2010).

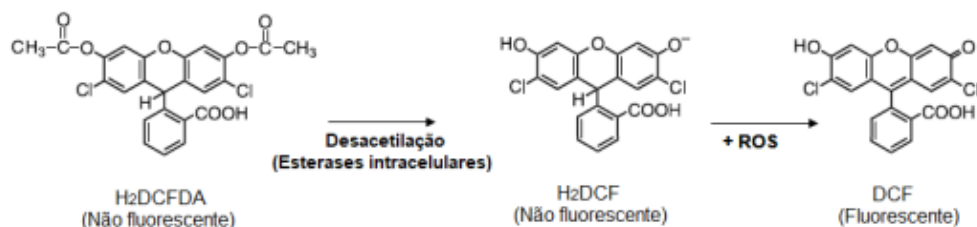


Figura 15- Reações para a detecção de fluorescência para metragem dos níveis de espécies reativas de oxigênio pelo fluoróforo H₂DCFDA. Fonte: LeBel *et al.*, 1992.

Nesta análise, tripomastigotas (2×10^6 /poço) foram incubados em meio HBSS suplementado com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), juntamente com o fármaco manidipino (em concentração de CE₅₀) por até 4h a 37°C em uma incubadora de CO₂ 5%. Posteriormente, foi adicionada a sonda H₂DCFDA (20 μM) e incubados novamente por 15 min. Azida (10 μM) foi utilizada como controle positivo para os níveis máximos de fluorescência, e como controle negativo, foram adicionados tripomastigotas não tratados. A leitura foi realizada no leitor de microplacas fluorimétrico MultiModo FilterMax F5 com comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 520 nm, respectivamente (Mesquita *et al.*, 2014). Para verificar a possível ocorrência de interferências na fluorescência, controles contendo apenas o fármaco e o fluoróforo foram adicionados.

3.7.5- Alteração nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)

Para possíveis alterações de níveis de ATP, foi utilizado um método de bioluminescência luciferina-luciferase por meio do *ATP Determination Kit*, através do qual tais níveis de ATP foram quantificados. O aumento das concentrações de ATP na célula pode estar diretamente relacionado ao aumento de luz, uma vez que na presença de Mg²⁺, a luciferase catalisa a reação da luciferina, ATP e O₂ para formar oxiluciferina, AMP, CO₂, pirofosfato e luz (**Figura 16**) (Johnson & Spence, 2010).

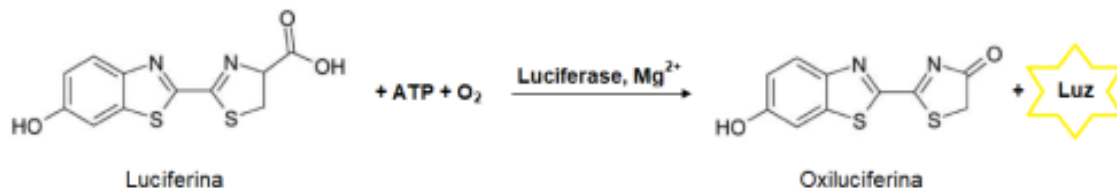


Figura 16- Reações para a detecção de luz, na metragem dos níveis de ATP pelo método de bioluminescência luciferina-luciferase. Fonte: Johnson & Spence, 2010.

Para análise dos níveis de ATP, tripomastigotas (2×10^6 parasitas/ poço) foram incubados em meio HBSS suplementado com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), juntamente com o fármaco manidipino (em concentração de CE₅₀) por até 4h a 37°C. Após este período, uma lavagem foi realizada, os parasitas foram lisados com Triton X-100 (0,5%) e um tampão de reação padrão (DTT 1 mM, luciferina 0,5 mM e luciferase 1,25 µg/ml) foram acrescentados. Os níveis de ATP foram medidos com um kit de bioluminescência (ATP Determination Kit-ThermoFisher). O CCCP (100 µM) foi utilizado como controle positivo, para níveis reduzidos de ATP, e tripomastigotas não tratados foram utilizados como controle negativo. A leitura foi realizada no luminômetro (FilterMax F5Multi-Mode) a 560 nm, e a quantidade de ATP foi calculada a partir de uma curva padrão de ATP (Amaral *et al.*, 2019).

3.8- Análise Estatística

A determinação dos valores de CC₅₀ e CE₅₀ foram realizadas a partir de curvas sigmóides dose-resposta e a significância estatística entre as amostras foram avaliadas através dos valores de P pelo método *One-way ANOVA*, por meio do teste *Tukey's Multiple Comparison*. Todas as análises foram feitas utilizando o software *Graph Pad Prism 6*. As amostras foram realizadas em duplicata, abrangendo duas ou mais repetições.

4- RESULTADOS

4.1- Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi* e Citotoxicidade em Mamíferos

Considerando estudos anteriores relatados sobre atividade anti-*T. cruzi* dos BCC aprovados pelo FDA (Reimão *et al.*, 2016), a eficácia *in vitro* do fármaco BCC manidipino, foi investigada contra ambas as formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Após 48 h de incubação, o fármaco resultou na eliminação de 100% dos parasitas intracelulares na concentração mais alta testada (20 μM) (**Figura 17**), acarretando um valor de CE_{50} de 0,1 μM (**Tabela 2**). Os macrófagos foram infectados com as formas amastigotas intracelulares, e após observação microscópica, as células apresentaram morfologia normal, sem características de toxicidade, com citoplasma e núcleo íntegros e bem delineados (**Figura 17**).

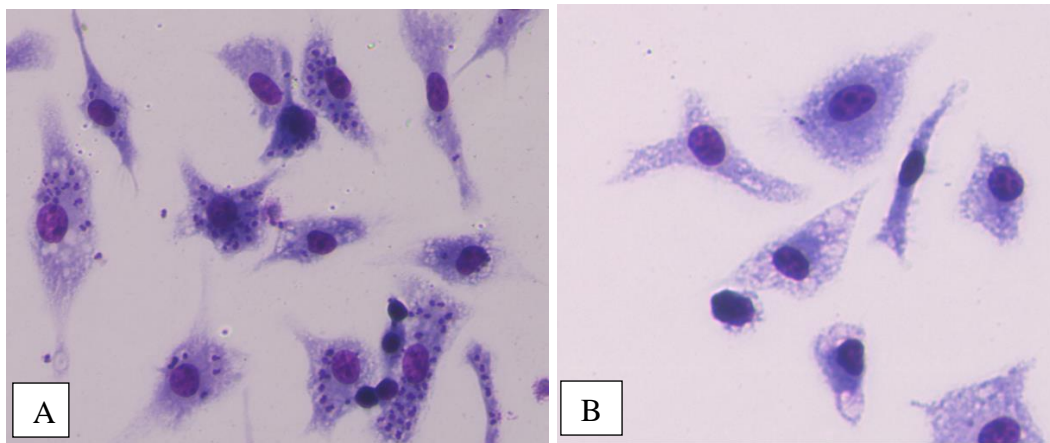


Figura 17- Imagens digitais de microscopia óptica (EVOS M5000, Thermo) obtida de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados com *T.cruzi*, tratados com manidipino e corados com Giemsa. (A) controle positivo (célula não tratada) e (B) célula tratada com o fármaco manidipino (5 μM); Imagens obtidas em aumento de 40X.

O fármaco também foi testado contra formas tripomastigotas, utilizando a resazurina para avaliação de viabilidade celular. Após 24 horas de incubação, o

manidipino também eliminou 100% dos tripomastigotas extracelulares, resultando em um valor de CE₅₀ de 3 µM (**Tabela 2**). O benznidazol foi utilizado como fármaco padrão, e apresentou um valor de CE₅₀ de 5 µM contra tripomastigotas e 18 µM contra amastigotas intracelulares.

Tabela 2- Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* e citotoxicidade em células de mamíferos dos fármacos manidipino e benznidazol.

Fármaco	CE ₅₀ (µM) ± DP		CC ₅₀ (µM) ± DP NCTC	IS amastigota
	tripomastigota /amastigota			
Manidipino	3,1 ± 1,4 / 0,1 ± 0,03		> 200	> 2.000
benznidazol	5,5 ± 2,2 / 18,7 ± 4,1		> 200	> 10,7

CE₅₀: concentração efetiva 50%; CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; IS: Índice de Seletividade, dado pela razão entre CC₅₀ em células NCTC / CE₅₀ em amastigotas intracelulares; DP: desvio padrão.

O fármaco em estudo também foi avaliado quanto à citotoxicidade em fibroblastos de mamíferos (células NCTC – clone L929) utilizando o método do MTT. Após 48 horas de incubação, o manidipino não apresentou toxicidade na concentração máxima testada (200 µM). Logo, considerando o índice de seletividade (IS), dado pela razão entre a citotoxicidade em mamíferos e o efeito antiparasitário em amastigotas intracelulares, viu-se que o manidipino resultou em um valor muito promissor de > 2.000. Por sua vez, o fármaco padrão, benznidazol, também não demonstrou toxicidade em células de mamíferos para a concentração máxima testada (200 µM), apresentando um IS de > 10,7. Logo, se comparado ao benznidazol, o manidipino apresentou

aproximadamente 50 vezes mais potência, quando testado em amastigotas intracelulares.

4.2- Mecanismo de Morte Parasitária

Os ensaios de mecanismo de ação foram realizados utilizando uma concentração efetiva 50% (CE₅₀) definida em tripomastigotas tratados com o fármaco manidipino, na concentração de 2×10^6 parasitas/poço, sendo tais parasitas observados visualmente no período de até 4 horas.

No período de incubação de 1h, mesmo na maior concentração testada, não houve morte de 50% dos parasitas. Já com 4h de incubação, o resultado de CE₅₀ foi similar ao de 2h, sendo 30 μ M. Por esse motivo o tempo de 2h a 4 horas foram escolhidos para prosseguir com os ensaios de mecanismo de ação. Entretanto para responder alguns questionamentos, mesmo não havendo morte total de 50% dos parasitas com o tempo de 1 hora de incubação, alguns ensaios de mecanismo de ação foram feitos neste período para verificar a presença de alguma alteração prévia.

4.2.1- Alterações na Permeabilidade da Membrana Plasmática

Por meio do fluoróforo Sytox Green, foi possível avaliar danos na integridade da membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi*. De acordo com dados apresentados na **Figura 18**, mesmo em até 2h de incubação com o fármaco manidipino (30 μ M), percebeu-se que não houve alteração da permeabilidade da membrana plasmática, uma vez que a fluorescência permaneceu similar ao controle (parasitas não tratados), não havendo entrada do fluoróforo, e por consequência, ligação com o DNA, sugerindo a integridade da membrana.

O controle positivo, o surfactante não iônico Triton X-100 apresentou permeabilização máxima, e quando comparado aos parasitas não tratados, obteve significância estatística desde o primeiro tempo com $p < 0,0001$.

A cada 20 min foram realizadas as leituras em um espectrofotômetro e a

porcentagem de permeabilização da membrana plasmática foi representada com dados normalizados em relação ao último tempo do controle positivo, 120 min, onde também foi representado a adição de Triton X-100 0,5% em todas as amostras, demonstrando a permeabilização de 100% dos parasitas.

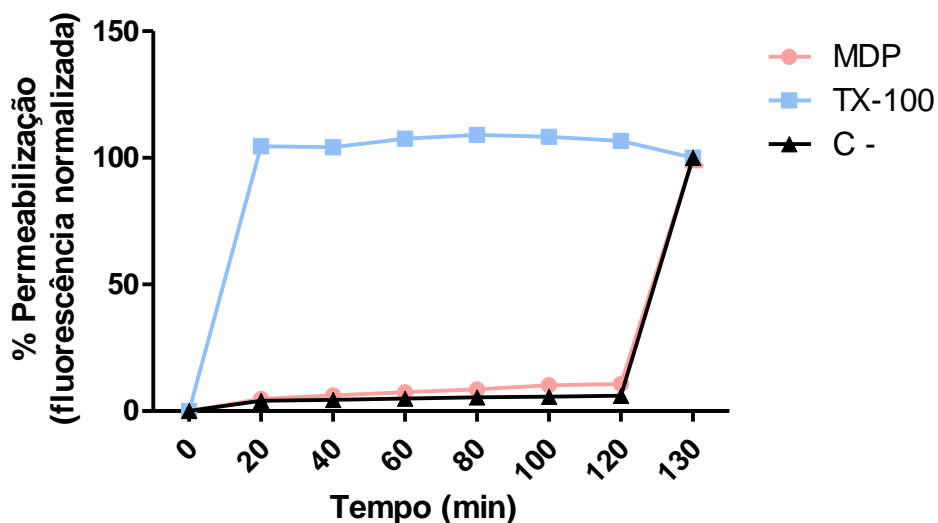


Figura 18- Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática através da sonda Sytox Green em tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com manidipino (30 μ M). Tripomastigotas tratados com Triton X-100 0,5% foram utilizados como controle positivo, e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (C -). Experimento representativo dentre dois ensaios realizados. MDP - manidipino *** $p < 0,0001$ em relação ao tempo 120min.

4.2.2- Alterações no Potencial de Membrana Plasmática ($\Delta\psi_p$)

Utilizando o fluoróforo bisoxonol DISBAC2 (3), foi avaliado o potencial de membrana plasmática em tripomastigotas de *T. cruzi*. O ensaio foi realizado por citometria de fluxo e o fármaco manidipino apresentou despolarização nos períodos de 1 e 2 horas de tratamento, com diferença estatisticamente significativa tanto em 1 h de incubação ($p < 0,0010$), quanto em 2 h de incubação ($p < 0,011$) (**Figura 19**). A porcentagem de despolarização do potencial de membrana plasmática foi representada com dados normalizados

em relação ao controle positivo em cada tempo, através dos diferentes níveis de fluorescência observados nos parasitas tratados e não tratados. O controle positivo, gramicidina (0,5 µg/mL), apresentou máxima polarização.

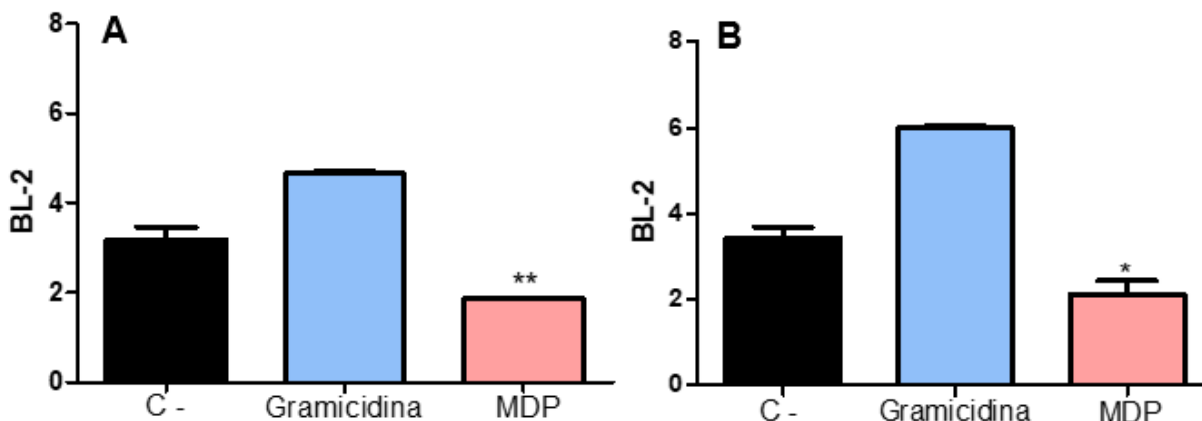


Figura 19- Avaliação do potencial elétrico da membrana plasmática ($\Delta\Psi_p$) através da sonda DISBAC2 (3) em tripomastigotas de *T. cruzi* tratados por 1 hora (A) e 2 horas (B). Tripomastigotas tratados com gramicidina (0,5 µg/mL) foram utilizados como controle positivo, e como controle negativo (C -) foram utilizados *T. cruzi* não tratado. A fluorescência foi quantificada calculando as porcentagens médias de parasitas não tratados (0%) e tratados com gramicidina (100%). ** $p < 0,0010$ (A) e * $p < 0,011$ (B). MDP-manidipino (30 µM). Experimento representativo de dois ensaios realizados.

4.2.3- Alteração do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Por meio do fluoróforo JC-1, foi realizada a avaliação do potencial de membrana mitocondrial em tripomastigotas de *T. cruzi*, por citometria de fluxo. De acordo com os dados apresentados pela **Figura 20**, se comparado aos parasitas não tratados, o fármaco manidipino apresentou em 2 horas de incubação uma intensa hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial, com significância estatística de $p < 0,0013$. Seguido por uma intensa despolarização do potencial de membrana mitocondrial em 4 horas de incubação ($p < 0,008$). O controle positivo, CCCP, apresentou despolarização máxima. Os níveis de fluorescência detectados no controle negativo representam o potencial normal da membrana mitocondrial da célula. Tanto a

hiperpolarização quanto a despolarização do potencial de membrana mitocondrial foram quantificadas calculando a razão entre os canais BL2 / BL1.

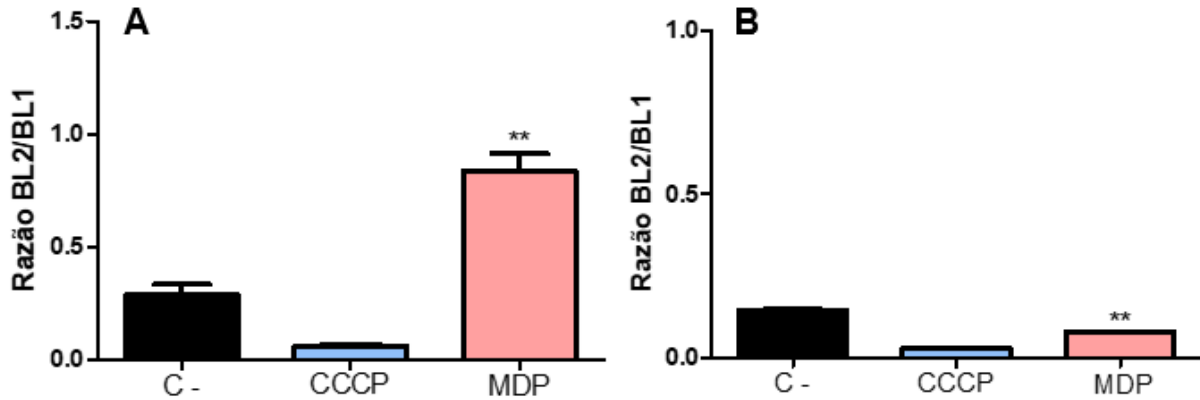


Figura 20- Avaliação do potencial da membrana mitocondrial em tripomastigotas de *T. cruzi* tratado com manidipino (30 μ M) por 2 horas (A) e 4 horas (B) marcados com sonda JC-1 (0,2 μ M). Tripomastigotas tratados com CCCP (100 μ g / mL) foram utilizados como controle positivo, e como controle negativo (C -), *T. cruzi* não tratados. A fluorescência foi quantificada calculando a razão entre os canais BL2 / BL1. ** $p < 0,0013$ (A) e ** $p < 0,008$ (B). MDP-manidipino. Experimento representativo de dois ensaios realizados.

4.2.4- Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)

Por meio do método de bioluminescência luciferina-luciferase (kit comercial Invitrogen), foram quantificados os níveis de ATP em tripomastigotas de *T. cruzi*. E considerando os dados referentes a **Figura 21**, é possível verificar que o tratamento com o fármaco manidipino (30 μ M) induziu uma redução significativa das concentrações de ATP em 1h ($p < 0,007$) e 2h ($p < 0,0043$) de tratamento, quando comparado ao controle (parasitas não tratados). O controle positivo, CCCP, apresentou níveis reduzidos de ATP.

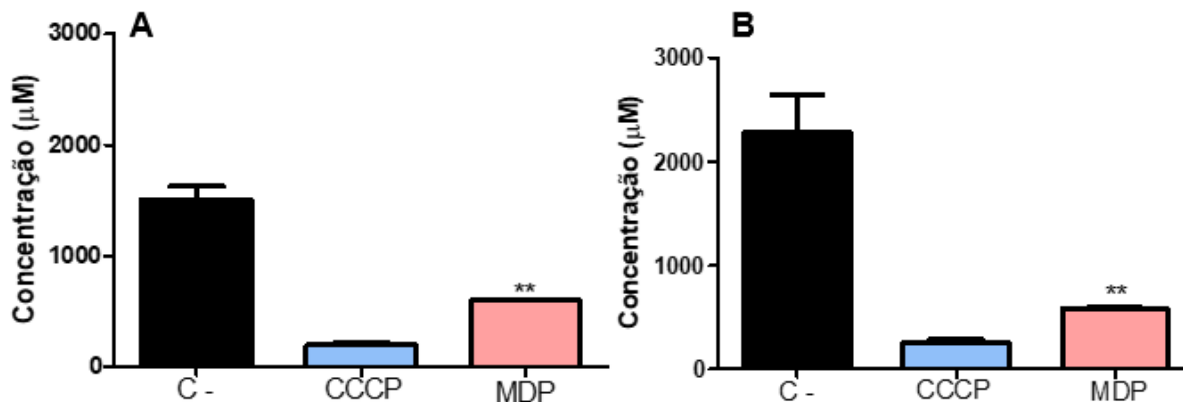


Figura 21- Avaliação dos níveis de ATP. O conteúdo de ATP foi mensurado pelo método de bioluminescência luciferina-luciferase após 1 (A) e 2 h (B) de incubação com manidipino (30 µM). O controle positivo foi dado por tripomastigotas tratados com CCCP (100 µg/mL), e, como controle negativo (C -), *T. cruzi* não tratados. ** $p < 0,007$ (A) e ** $p < 0,0043$ (B). MDP-manidipino. Experimento representativo de dois ensaios realizados.

4.2.5- Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Com a utilização do fluoróforo H₂DCFDA, os níveis de EROs foram avaliados em tripomastigotas de *T. cruzi*. E de acordo com os dados apresentados na **Figura 22**, em 4h de incubação com o fármaco manidipino (30 µM), houve um discreto aumento dos níveis de EROs em relação ao controle negativo (parasitas não tratados) ($p < 0,01$). O controle positivo, o composto azida (10 µM) apresentou produção máxima de EROs. A porcentagem de produção foi representada com dados normalizados em relação ao controle positivo.

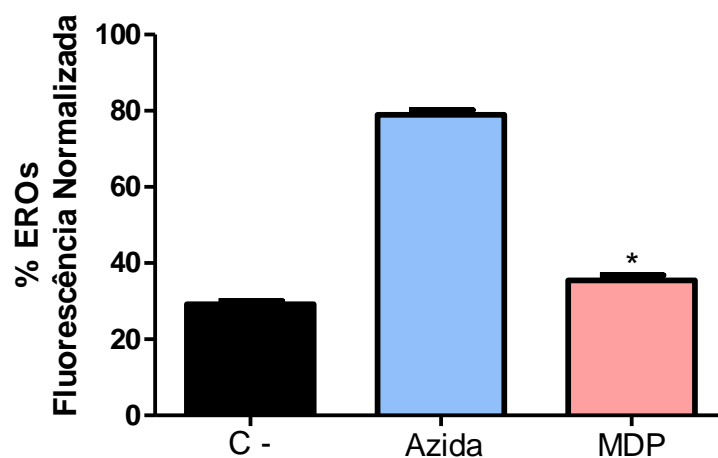


Figura 22- Avaliação dos níveis de EROs em tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com manidipino (30 μ M) por 4 horas, meio ao marcador H2DCF-DA. Azida (10 μ M) foi utilizada como controle positivo, e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (C -). * $p < 0,01$. MDP-manidipino. Experimento representativo de dois ensaios realizados.

5- DISCUSSÃO

Considerando a falta de efetividade e segurança das terapias existentes contra a doença, e atrelado ao fato que o processo de descoberta de medicamentos ser lento e caro, a estratégia de reposicionamento de fármacos é uma ferramenta que vem sendo bastante utilizada como alternativa para diversas enfermidades (O'Connor & Roth, 2005).

Os BCC são fármacos que interferem no fluxo do cálcio através dos canais e são usados principalmente como anti-hipertensivos. Alguns têm demonstrado atividade antiprotozoária, com interferência no aparelho mitocondrial único dos tripanossomatídeos (Reimão *et al.*, 2016). Nas células eucarióticas, a maior parte do ATP intracelular é derivado da fosforilação oxidativa mitocondrial, um processo complexo regulado em diferentes níveis mitocondrial e citosólico, contando com um bom equilíbrio de regulação de cálcio. Além disso, o Ca^{2+} mitocondrial demonstrou conduzir a produção de ATP em células de mamíferos. Então, através de um efeito bioquímico específico de um medicamento aprovado pela FDA, que afeta a homeostase do cálcio em células de mamíferos, o fármaco manidipino foi selecionado para avaliação da sua atividade *in vitro*. E considerando a importância da mitocôndria única para o parasita e a sua capacidade de afetar a homeostase do cálcio em células de mamíferos, seus potenciais efeitos letais foram investigados, utilizando citometria de fluxo e ensaios espectrofluorimétricos.

A eficácia *in vitro* do fármaco manidipino foi investigada pela primeira vez contra ambas as formas parasitárias, resultando na eliminação de 100% dos parasitas nas maiores concentrações testadas, e obtendo baixos índices de CE_{50} , 3,1 μM para as formas tripomastigotas, testados a 150 μM , e 0,1 μM para as formas amastigotas intracelulares, testados a 20 μM . Em relação a avaliação da atividade do manidipino contra amastigotas intracelulares, os macrófagos foram utilizados como células hospedeiras e, após o tratamento com o fármaco

e observação microscópica, as células apresentaram morfologia normal, sem características de toxicidade, com núcleo e citoplasma íntegros e bem delineados.

O cálcio está envolvido em inúmeras funções em *Trypanosomatidae*, incluindo diferenciação e invasão de células hospedeiras. As mitocôndrias únicas acumulam cálcio via potencial eletroquímico mitocondrial como força motriz da captação de cálcio (Benaim *et al.*, 2013). Na membrana plasmática do parasita, a Ca^{2+} ATPase (PMCA) demonstrou ser responsável pela extrusão de Ca^{2+} . (Benaim *et al.*, 2020). E em *Leishmania mexicana*, um canal de Ca^{2+} sensível à esfingosina também foi identificado na membrana plasmática (Benaim *et al.*, 2013). Demonstrou-se então, que vários fármacos anti-*T. cruzi* modulam um ou mais desses mecanismos para a regulação do Ca^{2+} . Logo, a perda da homeostase intracelular do cálcio tem sido considerada um alvo promissor contra o *T. cruzi* (Barrera *et al.*, 2020). Pollo e colaboradores sintetizaram uma série de 21 derivados de BCC e resultaram em compostos com boa seletividade, apresentando valores de CE_{50} entre 5 e 42 μM contra *T. cruzi* (Pollo *et al.*, 2017).

O manidipino também foi testado quanto à citotoxicidade em mamíferos, especificamente em fibroblastos, e não apresentou toxicidade para a concentração máxima testada (200 μM). Considerando o índice de seletividade (IS), se comparado ao fármaco padrão, benznidazol (IS > 10,7), o manidipino apresentou aproximadamente 50 vezes mais potência quando testado contra amastigotas intracelulares, com um IS > 2.000.

De acordo com o DNDi, o critério ideal para a seleção de candidatos a fármacos inclui compostos com valores de CE_{50} abaixo de 10 μM e índice de seletividade > 10 (Don, 2013). Pode-se observar então que o fármaco manidipino cumpriu efetivamente tais critérios, mostrando uma seletividade muito promissora quando comparada aos demais aprovados pela FDA e que apresentam atividade anti-*T. cruzi* (Planer *et al.*, 2014). Além disso, o DNDi também afirma que os medicamentos que visam apenas os estágios de

replicação do parasita (formas amastigotas), podem possibilitar também formas não replicantes (tripomastigotas), capazes de manter as infecções por muito tempo, após o término do tratamento (Katsuno *et al.*, 2015). O manidipino, por sua vez, foi capaz de eliminar ambas as formas parasitárias, em baixas concentrações.

O fármaco manidipino é um BCC de diidropiridina, de terceira geração, com alto grau de seletividade para a vasculatura (Kostis, 2003). Diferentes estudos demonstraram que o fármaco exerce efeitos positivos nos parâmetros metabólicos da população hipertensa, aumentando a sensibilidade à insulina, estimulando a formação e a diferenciação de adipócitos, além de preservar a atividade dos receptores PPAR- γ , que são receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação (Tavares *et al.*, 2007).

Ainda de acordo com a recomendação do DNDi, o Target Product Profile (TPP) ideal para um novo medicamento contra a doença de Chagas é um medicamento oral, com potencial seguro e sem potencial pró-arrítmico. O manidipino por sua vez, é apresentado por meio de formulação oral e não produz efeitos significativos no coração ou no sistema nervoso central (McKeage, 2004).

O perfil farmacocinético demonstra que após uma dose oral única de 20 mg em voluntários saudáveis, a meia-vida é de aproximadamente 8 horas (Cheer, 2001; Stockis *et al.*, 2003). O fármaco é extensivamente metabolizado pelas enzimas do citocromo (CYP) P450 em derivados de piridina e difenilmetano. Embora nenhum estudo tenha sido relatado até o momento sobre o efeito anti-*T. cruzi* de metabólitos do manidipino, os difenilmetanos e os derivados de piridina são estruturas conhecidas que apresentam atividades antimicrobiana e anti-*T. cruzi*, respectivamente (Neres *et al.*, 2007).

Através do estudo do mecanismo de ação de fármacos pode-se obter informações importantes para a otimização da seletividade e para a

identificação de novos alvos bioquímicos (Schenone *et al.*, 2013; Katsuno *et al.*, 2015). O primeiro alvo estudado foi a membrana plasmática, que regula o transporte de nutrientes, a homeostase do pH e outros íons, tornando-se essencial para a sobrevivência e um alvo importante de pesquisa. E justamente por ter esse importante papel na sobrevivência do parasita, o estudo da membrana plasmática se torna indispensável para a investigação do mecanismo de ação (Chattopadhyay & Jafurulla, 2011; Tiwari *et al.*, 2018). Então, para avaliar sua integridade, o *Sytox Green* foi utilizado como sonda fluorescente, e o fármaco manidipino não alterou a permeabilidade da membrana plasmática em até 2 horas de incubação.

Ainda em relação a membrana plasmática, outra abordagem para avaliação é o estudo de seu potencial elétrico, uma vez que suas variações são extremamente prejudiciais ao parasita, podendo levar a formação de poros transmembranais (Morth *et al.*, 2011). Outro critério importante a ser mencionado é o transporte ativo de metabólitos, que pode ser bastante afetado, levando a prejuízos na aquisição de nutrientes essenciais para a proliferação e para atividades celulares (Venkatesh *et al.*, 2017). Nesse estudo, os resultados obtidos demonstraram que apesar de não haver alteração na permeabilidade da membrana plasmática, o fármaco manidipino diminuiu seu potencial elétrico da membrana plasmática em 1 e 2 horas de incubação, causando despolarização da mesma. É possível inferir que por não causar mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, que as mudanças no potencial sejam apenas resultado da entrada do fármaco na célula, que altera o fluxo de íons. Dessa forma, o potencial pode ser reestabelecido uma vez que a entrada de composto seja cessada e a concentração intracelular atinja níveis máximos (Morth *et al.*, 2011).

É interessante considerar que ao contrário das células de mamíferos, os tripanosomatídeos apresentam uma única mitocôndria, essencial para atender as necessidades energéticas e vital para a sobrevivência. Então, a pesquisa por fármacos que afetam essa organela pode ser uma interessante estratégia para

busca de novas terapias (Vannier-Santos *et al.*, 2002; Kaczanowski *et al.*, 2011). Foi demonstrado um efeito duradouro do fármaco manidipino na mitocôndria do parasita. Uma hiperpolarização do potencial da membrana mitocondrial foi observada em 2 horas de incubação, seguida por uma despolarização intensa e significativa em 4 horas de incubação. O potencial da membrana mitocondrial é o resultado de um gradiente eletroquímico e é essencial para manter a função fisiológica na cadeia respiratória, gerando ATP. O efeito letal de diferentes fármacos tem sido atribuído ao comprometimento bioenergético do *T. cruzi* (Joshi & Bakowska, 2011) e está no foco de muitas estratégias de descoberta de drogas (Vannier-Santos *et al.*, 2002; Kaczanowski *et al.*, 2011).

Em relação aos níveis de ATP, sabe-se que é um mediador universal de metabolismo e sinalização, além de ser também a fonte de energia mais importante para as células. Como já destacado, o ATP é produzido pela mitocôndria através da cadeia respiratória e uma diminuição em seus níveis pode ocorrer caso a membrana mitocondrial seja despolarizada, já que tal alteração leva ao aumento da permeabilidade de prótons e consequente dano a fosforilação oxidativa (Joshi & Bakowska, 2011; Menna-Barreto & Castro, 2014; Rajendran *et al.*, 2016). Então, como resultado, níveis baixos de ATP podem gerar prejuízos ao metabolismo, levando o parasita à morte (Manzano *et al.*, 2011). O fármaco manidipino também diminuiu os níveis de ATP dos tripomastigotas tratados em 1 e 2 horas de incubação. Sendo assim, a partir desse resultado, é possível sugerir que a redução de ATP seja uma alteração bioenergética nas mitocôndrias, que foi posteriormente confirmada pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial.

Por fim, ainda analisando tais alterações bioenergéticas, é importante considerar que a mitocôndria é também a maior fonte de EROs. E a produção de ATP está atrelada a de tais espécies reativas. Sabe-se que sob condições fisiológicas, a produção de ATP gera de 3 a 5% de EROs sobre o total de oxigênio consumido (Boonstra & Post, 2004; Lejay *et al.*, 2012). Os fármacos

que inibem a cadeia respiratória gerando estresse oxidativo, tendem a aumentar rapidamente essa produção de EROs (Mattiuzzi *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2010). E essas espécies podem causar danos celulares, se produzidas em excesso, especialmente quando o sistema antioxidativo dos parasitas não é capaz de controlar sua concentração intracelular (Menna-Barreto & Castro, 2014). O fármaco manidipino promove um aumento nos níveis de EROs em 4 horas de incubação, causando danos permanentes e levando o parasita à morte. Mais estudos serão necessários para investigar o alvo molecular do fármaco manidipino em *T. cruzi*.

Por meio da análise de todos os resultados, é possível propor um mecanismo de ação para o fármaco manidipino em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Ao atravessar a membrana plasmática, o fármaco causa despolarização do seu potencial elétrico, sem alteração da permeabilidade. A diminuição dos níveis de ATP sugere uma alteração bioenergética nas mitocôndrias, que foi confirmado posteriormente pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial e aumento dos níveis de EROs.

6- CONCLUSÕES

Por meio da abordagem de reposicionamento de fármacos, foi encontrado um fármaco potente e seletivo contra *T. cruzi*.

- O fármaco manidipino foi 50 vezes mais potente contra amastigotas intracelulares em comparação ao fármaco padrão benznidazol, exibindo alto índice de seletividade e elevada potência *in vitro*.
- A análise do mecanismo de ação em tripomastigotas, sugere que o composto não induz a permeabilização da membrana plasmática, nem mesmo a formação de poros. No entanto, induz uma despolarização no potencial da membrana, justificado pela perturbação gerada na entrada do fármaco.
- Em relação as análises bioenergéticas, a alteração mitocondrial pode ser o efeito letal mais importante do manidipino contra o parasita, afetando a produção de ATP e gerando estresse oxidativo.
- Estudos adicionais de eficácia em modelo animal são indicados, porém, um perfil farmacocinético do fármaco manidipino deve ser previamente determinado, contribuindo para um ensaio de eficácia *in vivo* racional e bem projetado, uma vez que a potência e seletividade deste fármaco aprovado pela FDA merece mais investigação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-antagonist drugs. N. Engl. J. Med., 1999. 341, 1447–1157.

Amaral M, de Sousa FS, Costa-Silva TA, Junior AJG, Taniwaki NN, Johns DM, Lago JHG, Anderson EA, Tempone AG. A semi-synthetic neolignan derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. Sci. Rep., 2019. 9, 6099-6114.

Application 209570 (Benznidazole). U.S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation Research, 2016.

Apt W, Zulantay I. [Update on the treatment of Chagas' disease]. Rev Med Chil., 2011. 139(2): 247-257.

Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. 104(1): 9-16.

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. ProcNatlAcadSci., 2004. 101(7): 2034-2039.

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.

Barrera P, Skorka C, Boktor M, Dave N, Jimenez VA. A Novel Calcium-Activated Potassium Channel Controls Membrane Potential and Intracellular pH in *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 2020. 9, 447-464.

Benaim, G. Intracellular Calcium Signaling and Regulation in Leishmania. Molecular and Immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. R.G. Landes Co. Medical Intelligence Unit, Austin, Texas, 1996. 5: 89-106.

Benaim G, Garcia CRS. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis – a review. *Tropical Biomedicine*, 2011. 28(3): 471–481.

Benaim G, García-Marchán Y, Reyes C, Uzcanga G, Figarella K. Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2013. 430, 1091-1096.

Benaim G, Paniz-Mondolfi AE, Sordillo EM, Martinez-Sotillo N. Disruption of Intracellular Calcium Homeostasis as a Therapeutic Target Against *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2020. 10, 31-46.

Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.*, 1988. 106: 1349-1358.

Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2004; 337:1-13.

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

Buckner FS, Urbina JA. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2012. 2: 236–242.

Burleigh BA, Andrews NW. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995. 27: 175-200.

Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54: 5344–5351.

Center for Disease Control and Prevention. American Trypanosomiasis [Citado 2019. – acesso em 17 de abril de 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

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.

Chang K-P, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: *in vitro* systems and their applications. *Methods Enzymol.*, 1986. 132: 603-626.

Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011. 416: 7-12.

Cheer SM, McClellan K. Manidipine. *Drugs*, 2001. 61: 1777–1799.

Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun.*, 1993; 197: 40-45.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in amazonian Brazil. *Trends Parasitol.*, 2002. 18: 171-176.

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

Croft, S. L., & Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection.*, 2011. 17(10): 1478–1483.

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

de Toranzo EG, Masana M, Castro JA. Administration of benznidazole, a chemotherapeutic agent against Chagas disease, to pregnant rats. Covalent binding of reactive metabolites to fetal and maternal proteins. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 1984. 272(1): 17-23.

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

Don R, Ioset, JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitol.*, 2013. 141: 140–146.

DNDi, Drug for Neglected Diseases initiative. América Latina. Doença de chagas: O que é a doença de Chagas? [acesso em 12 de abril de 2020]. Disponível em <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>

DrugBank. [Citado 2020 - acesso em 02 de maio de 2020]. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09238>

DrugBank. [Citado 2020 - acesso em 02 de maio de 2020]. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11989>

DrugBank. [Citado 2020 - acesso em 02 de maio de 2020]. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11820>

Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008. 103(5): 514-516.

Ferreira HD. [Clinico-therapeutic trial with benzonidazole in Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1976. 18(5): 357-364.

Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc.*, 2011. 83(3): 1041-1044.

Franco R, Bortner CD, Cidlowski JA. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *J Membr Biol.*, 2006. 209: 43-58.

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. História [Citado 2017 – acesso em 12 de abril de 2020]. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/historia/>

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. Organização estrutural [Citado 2017 – acesso em 17 de abril de 2020]. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/organizacao-estrutural/>

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. Vetor [Citado 2017 – acesso em 12 de abril de 2020]. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/vetor/>

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. [Citado 2013 – acesso em 12 de abril de 2020]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

Garcia CR, de Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA, Bannister, L. Plasmodium in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *International Reviews in Cellular and Molecular Biology*, 2008. 266: 85-156.

Gorla NB, Castro JA. Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benznidazole. *Toxicology letters*, 1985. 25(3): 259-263.

Heller A, Brockhoff G, Goepferich A. Targeting drugs to mitochondria. *Eur J Pharm Biopharm.*, 2012. 82:1-18.

Huang G, Ulrich PN, Storey M, Johnson D, Tischer J, Tovar JA. Proteomic analysis of the acidocalcisome, an organelle conserved from bacteria to human cells. *PLOS Pathog.*, 2014. 12: e1004555.

Johnson I, Spence MTZ, editores. The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. Carlsbad: Life Technologies, 2010. e11.

Joshi DC, Bakowska JC. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. J. Vis. Exp., 2011. 51: e2704.

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.

Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. Parasit Vectors, 2011. 4:1-8.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. Nat Rev Drug Discov., 2015. 14:751-758.

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: 862-867.

Kostis JB. Treatment of hypertension in older patients: an updated look at the role of calcium antagonists. Am J Geriatric Cardiol., 2003. 12 (5): 319-27.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem.*, 2009. 284: 15496-15504.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.*, 1992. 5: 227-231.

Lejay A, Charles AL, Zoll J, Bouitbir J, Thaveau F, Piquard F, Geny B. Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease: usefulness of muscle biopsy. *Muscle Biopsy*, 2012. 2012: 133-154.

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.

LHSC, London Health Sciences Centre. All about mitochondria. [Citado 2012 - acesso em 3 de junho de 2020]. Disponível em: http://www.lhsc.on.ca/Patients_Families_Visitors/Genetics/Inherited_Metabolic/Mitochondria/AllAboutMitochondria.htm.

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. 6: 1001-1002.

Londero VS, Costa-Silva TA, Gomes KS, Ferreir DD, Mesquita JT, Tempone AG, Young MCM, Jerz G, Lago JHG. Acetylenic fatty acids from *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*:

Effect of octadec-9-ynoic acid in plasma membrane electric potential. *Bioorg. Chem.*, 2018. 78, 307-311.

Luque-Ortega JR, Rivas L. Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.*, 2010. 618: 393-420.

Manzano JI, Carvalho L, Pérez-Victoria JM, Castanys S, Gamarro F. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55: 1045-1052.

Marin-Neto JA, Rassi Júnior A, Avezum Júnior A, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, 2009. 104: 319-324.

Marr AK, McGwire BS, McMaster WR. Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiol.*, 2012. 7: 1047-1059.

Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet.*, 2004. 13: 869-879.

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

McKeage K, Scott LJ. Manidipine. *Drugs*, 2004. 64(17): 1923–1940.

Menna-Barreto RFS, Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed Research International*, 2014. 1-14.

Mesquita JT, Costa-Silva TA., Borborema SET, Tempone AG. Activity of Imidazole Compounds on *Leishmania (L.) Infantum Chagasi*: Reactive Oxygen Species Induced by Econazole. *Mol. Cell Biochem.*, 2014. 389: 293-300.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Estado da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica, 2009. e7.

Misra S, Naskar K, Sarkar D, Ghosh DK. Role of Ca²⁺ ion on Leishmania-macrophage attachment. *Mol. Cel. Biochem.*, 1991. 102: 13–18.

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): 207-210.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf, S for the BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 2015. 373(14): 1295–1306.

Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG, Nissen P. A structural overview of the plasma membrane Na⁺,

K⁺- ATPase and H⁺- ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2011. 12: 60-70.

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

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem.*, 2002. 277: 24717-24727.

Neres J, Bonnet P, Edwards PN, Kotian PL, Buschiazzo A, Alzari PM, Bryce RA, Douglas KT. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007. 15: 2106-2119.

Novac N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2013. 34(5): 267–272.

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: 1005-1014.

Oliveira MF, Dias ATN, Pontes VMO, Souza Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Ver. Patol. Trop.*, 2008. 37(3): 209-228.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003. 4: 552-565.

Padhy BM, Gupta YK. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *J Postgrad Med.*, 2011. 57(2): 153-160.

Palit P, Ali N. Oral Therapy With Amlodipine and Lacidipine, 1,4 Dihydropyridine Derivatives Showing Activity Against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. 52(1): 374-377.

Patel S, Docampo R. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends Cell. Biol.*, 2010. 277–286.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi ME, Hotez PJ. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis.*, 2016. 10(2): e0004343.

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

Perin L, Moreira da Silva R, Fonseca KD. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. 61(4).

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 2011. 50: 98-115.

Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014. 8: e2977.

Pollo LAE, de Moraes MH, Cisilotto J, Creczynski-Pasa TB, Biavatti MW, Steindel M, Sandjo LP. Synthesis and in vitro evaluation of Ca²⁺ channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*: SAR analysis. *Parasitol. Int.*, 2017. 66, 789-797.

Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging adenosine triphosphate (ATP). *Biol Bull*, 2016. 231: 73-84.

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

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: 1032-1038.

Reimão JQ, Mesquita JT, Ferreira DD, Tempone AG. Investigation of Calcium Channel Blockers as Antiprotozoal Agents and Their Interference in the Metabolism of *Leishmania (L.) infantum*. *J.Q. Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2016. 1-9.

Rey, L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001.

Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO. New improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2009. 7: e484.

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(1): 246–251.

Schenone M, Dančik V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 2013. 9: 232–240.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007. 102 (1): 75-85.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. (ISSN 2358-9450. Vol 46, no. 21. 2015).

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

Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem.*, 2014. 289(13): 8735-8741.

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. *Ver. Patol. Trop.*, 2007. 36(2): 103-118.

Soeiro M de N, de Castro SL. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: in vitro and in vivo studies. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 2011. 5: 21–30.

Soeiro MN, Werbovetz K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology*, 2013. 140: 929–951.

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. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 2013. 46(4): 510-514.

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

Stockis A, Gengler C, Goethals F, Jeanbapt iste B, Lens S, Poli G, Daniel, A. Single Oral Dose Pharmacokinetic Interaction Study of Manidipine and Delapril in Healthy Volunteers. *Arzneimittelforschung*, 2003. 53: 627-634.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*, 1986. 93: 157-165.

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

Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 2007. 51(4): 526-533.

Teixeira AR, Calixto MA, Teixeira ML. Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mutation research*, 1994. 305(2): 189 - 196.

Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrebc M, Svoboda M. *Trypanosomacruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplastminicircles. *Experimental parasitology*, 2006. 114: 279- 288.

Tempone AG, Sartorelli P, Mady C, Fernandes F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanossomiasis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.*, 2007. 5: 222-235.

Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem.*, 2018. 18: 26-41.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 2001. 31: 472-481.

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des.*, 2002. 8: 297-318.

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. 40(1): 61-71.

Venkatesh M, Barathi VA, Goh ETL, Anggara R, Fazil MHUT, Ng AJY, Harini S, Aung TT, Fox SJ, Liu S, Yang L, Barkham TMS, Loh XJ, Verma NK, Beuerman RW, Lakshminarayanan R. Antimicrobial activity and cell selectivity of synthetic and biosynthetic cationic polymers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. 61: e469-417.

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. 52(3): 151-156.

Watanabe H. Block of T-type calcium channel by dihydropyridine calcium antagonists [in Japanese]. *Teikyo Medical Journal*, 2003. 26 (6): 425-33.

World Health Organization. Neglected disease. Summary. [Citado 2020 - acesso em 15 de setembro de 2020]. Disponível em https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/summary/en/.

Wulsten IF, Costa-Silva TA, Mesquita JT, Lima ML, Galuppo MK, Taniwaki NN, Borborema SET, Costa FB, Schmidt TJ, Tempone AG. Investigation of the anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* activity of some natural sesquiterpene lactones. *Molecules*, 2017. 22: 685.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium*, 2011. 50: 211-221.



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



ANEXO E

São Paulo, 27 de setembro de 2018.

Protocolo 05/2018.
Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Seleção e Otimização de Novos Candidatos a Fármacos para Leishmaniose e Doença de Chagas**”, sob a responsabilidade da **Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, funcionário do Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **82ª** reunião realizada em **25/09/2018**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/10/2021
Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	Balb/c
Nº de animais	112
Idade	30 dias - recém desmamados
Peso	20 a 25 gr
Sexo	56 fêmeas e 56 machos
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo – SP – CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/10/2021
Espécie	Hamster
Linhagem	Dourado
N° de animais	30
Idade	30 dias - recém desmamados
Peso	60 gr
Sexo	30 machos
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo – SP – CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br