

Rafaela da Silva Oliveira

Quelantes metálicos glicosilados como agentes
anti-*Trypanosoma cruzi*



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2021**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Marta Helena Branquinha de Sá e coorientação de Leandro Stefano Sangenito

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Rafaela da Silva

Quelantes metálicos glicosilados como agentes anti-*Trypanosoma cruzi*/
Rafaela da Silva Oliveira. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2021.

xi; 52 f. : il ; 30 cm

Orientador: Marta Helena Branquinha de Sá

Coorientador: Leandro Stefano Sangenito

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2021.

Bibliografia: f. 32-37

1. *Trypanosoma cruzi*
2. Doença de Chagas
3. Complexos metálicos
4. Doença tropical negligenciada

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES /
UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Rafaela da Silva Oliveira**
DRE: 117125189

BANCA EXAMINADORA: Prof. Dirlei Nico (Presidente)
Prof. Igor de Almeida Rodrigues
Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa
Prof. Leonardo Nimrichter (Suplente)

Título da Monografia: **“Quelantes metálicos glicosilados como agentes antiTrypanosoma cruzi”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/vnt-norr-wbz> Data
e hora de início: **10 de junho de 2021 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **9,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de junho de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
9,0	Profa. Dirlei Nico
9,0	Prof. Igor de Almeida Rodrigues
—	Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa
9,0	Prof. Leonardo Nimrichter

Presidente da banca



Prof. Dirlei Nico

Aluno:



Rafaela da Silva Oliveira

Orientador:

Prof. Marta Helena Branquinha de Sá / Coorientador: Leandro Stefano Sengenito

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia a minha mãe e pai, Maria de Fátima e Jaime, e à minha tia Elcinéia; que infelizmente nos deixou antes da finalização deste trabalho. O incentivo de vocês sempre foi fundamental à minha persistência nos estudos, e só por isso estamos aqui hoje. Não existe palavras que exponham a minha eterna gratidão. Muito obrigada por serem tão maravilhosos, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores, Leandro Sangenito, Marta Branquinha e André Santos. Vocês sempre me orientaram da melhor maneira possível, sempre se disponibilizando para tirar dúvidas, darem conselhos, e até puxões de orelha quando necessário. Sou extremamente grata por cada minuto que vocês investiram na minha formação. Muito obrigada!

Aos meus amigos de laboratório: Iuri, Glauber, Lucas Magalhães, Joice, Lucas Giovanini e Claudyanne, pelas conversas, risadas incontroláveis e companheirismo. Vocês são incríveis, obrigada!

As meninas do laboratório, Simone, Lucieri, Thaís, Heloísa, Lívia, Nayhara, Laura, Vanessa e Denise, que sempre se dispuseram a me ajudar com qualquer dúvida que eu tivesse. Obrigada!

Aos professores do instituto de microbiologia que sempre se dedicaram aos alunos e tornaram a micro meu segundo lar, muito obrigada.

Aos professores que integram a minha banca, Dirlei Nico, Igor Almeida e Anderson Guimarães, assim como ao suplente professor Leonardo Nimrichter, por terem se disponibilizado a avaliar este trabalho.

Á minha família, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por sempre acreditarem em mim!

Aos meus amigos, Júlia, Gabriel e Talita, vocês foram fundamentais. Obrigada por todos os anos de amizade sincera, todas as vezes que vocês me esperaram sair do laboratório. Vocês são a razão da minha sanidade mental!

E também à todos que me ajudaram indiretamente no amadurecimento deste trabalho de monografia.

Enfim ao CNPq e FAPERJ, por todo apoio financeiro que tornaram este trabalho viável!

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade derivada da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que se estima afetar 6 milhões de indivíduos e causar 12 mil mortes anuais. Esta patologia é caracterizada pela falta de sintomas específicos na fase aguda, levando o indivíduo a descobrir a doença geralmente na fase crônica, que pode aparecer até 20 anos após a infecção. Embora afete múltiplas pessoas, esta enfermidade é uma doença negligenciada, uma vez que os locais de endemicidade possuem condições de vida precárias. Assim sendo, existem apenas duas linhas de tratamento, porém no Brasil só uma é aprovada para uso clínico, o benznidazol. Entretanto este medicamento não é classificado como ótimo, já que apresenta diversos efeitos colaterais e uma eficácia que declina progressivamente devido ao aparecimento de cepas resistentes. Afim de suprir esta escassez, novos fármacos estão sendo desenvolvidos e/ou reposicionados, como por exemplo o posaconazol. Outra alternativa é o uso terapêutico de complexos metálicos. Nesse contexto, resultados recentes do nosso grupo apontam que derivados de aminopiridina complexados a Cu^{2+} são efetivos contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e dois compostos se destacaram: o (3a) $\text{L112CuCl}_2(\text{ClO}_4)_2$ e (3b) AGL112CuCl_2 . Estes compostos reduziram mais a viabilidade celular parasitária do que o benznidazol, apresentando respectivamente valores de DL_{50} de 1,7 e 1,8 μM . Com base nestes resultados, no presente trabalho foi avaliado o efeito dos compostos sobre o metabolismo e o potencial de membrana mitocondrial do parasito, bem como sua toxicidade para as células hospedeiras e seus efeitos em uma interação parasito-célula hospedeira. Estes experimentos foram selecionados afim de determinar o índice de seletividade (IS) dos compostos. Através do ensaio de MTT foi possível observar que o tratamento com concentrações referentes ao DL_{50} reduziu significativamente o metabolismo mitocondrial parasitário de tripomastigotas (cepa Y). Resultado similar foi visto no experimento de potencial de membrana mitocondrial, onde utilizando o corante JC-1 viu-se que nas três concentrações utilizadas ($\frac{1}{2}\text{DL}_{50}$, DL_{50} e $2 \times \text{DL}_{50}$) os compostos despolarizam a membrana. Os compostos apresentaram baixa toxicidade sobre as células hospedeiras, onde foi possível determinar o valor de CC_{50} dos compostos 3a e 3b, em um tratamento de 24 h (307,1 e 269,7 μM) e 72 h (125,7 e 175,2 μM), respectivamente. A interação foi estabelecida em um modelo de tratamento durante 72h pós-infecção, e com base neste determinou-se o valor de IC_{50} dos compostos sobre as formas amastigotas intracelulares como 14,6 μM para o 3a e 22,4 μM para o 3b. Desta forma foi estabelecido o IS de 24h e 72h —respectivamente— dos compostos 3a (180,6 e 8,6) e 3b (149,8 e 7,82) e estes foram considerados extremamente satisfatórios. Por fim, além destes compostos serem fáceis de sintetizar e possuírem baixo custo de produção, nossos resultados evidenciam que os derivados metálicos de aminopiridinas detêm grande potencial, tornando-os atraentes para o estudo de novos fármacos visando o tratamento da doença de Chagas e outras parasitoses.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Doença tropical negligenciada, complexos metálicos.

ABSTRACT

Chagas disease is a illness derived from the infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is estimated to affect 6 million individuals and cause 12,000 deaths annually. This pathology is characterized by the lack of specific symptoms in the acute phase, leading the individual to discover the disease usually in the chronic phase, which can appear up to 20 years after infection. Although it affects multiple people, this is a neglected disease, since endemic regions have precarious living conditions. Therefore, there are only two lines of treatment, but in Brazil only one is approved for clinical use, the benznidazole. However, this medication is not classified as excellent, as it has several side effects and an efficacy that declines progressively due to the appearance of resistant strains. In order to make up for this shortage, new drugs are being developed and/or repositioned, such as posaconazole. Another alternative is the therapeutic use of metal complexes. In this context, recent results from our group point out that aminopyridine derivatives complexed with Cu^{2+} are effective against the trypomastigote forms of *T. cruzi*, as two compounds stood out: the (3a) $\text{L112CuCl}_2(\text{ClO}_4)_2$ and (3b) AGL112CuCl_2 . These compounds reduced the parasitic cell viability more than benznidazole, with LD_{50} values of 1.7 and 1.8 μM , respectively. Based on these results, the present work evaluated the effects of the compounds on the parasite's metabolism and mitochondrial membrane potential, as well as their toxicity to host cells and their effects on the parasite-host cell interaction. These experiments were selected in order to determine the selectivity index (IS) of the compounds. Through the MTT assay, it was possible to observe that the treatment with concentrations referring to the LD_{50} significantly reduced the parasitic mitochondrial metabolism of trypomastigotes (strain Y). A similar result was seen in the mitochondrial membrane potential assay, where using the JC-1 dye it was observed that in all three concentrations used ($\frac{1}{2}\text{DL}_{50}$, DL_{50} and $2 \times \text{DL}_{50}$) the compounds depolarize the membrane. The compounds showed low toxicity on the host cells, where it was possible to determine the CC_{50} value of the compounds 3a and 3b, in a treatment of 24 h (307.1 and 269.7 μM) and 72 h (125.7 and 175, 2 μM), respectively. The interaction was established in a treatment model for 72 hours post-infection, and based on this, the IC_{50} value of the compounds for the intracellular amastigote forms was determined as 14.6 μM for the 3a and 22.4 μM for the 3b. In this way, the IS of 24h and 72h, respectively, of the compounds 3a (180.6 and 8.6) and 3b (149.8 and 7.82) were established and these were considered extremely satisfactory. Finally, in addition to these compounds being easy to synthesize and having low production costs, our results show that the metal derivatives of aminopyridines have great potential, making them attractive for the study of new drugs aiming at the treatment of Chagas disease and other parasites.

Key-words: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, Neglected tropical disease, metal complexes.

RESUMO PARA LEIGOS

A doença de Chagas também conhecida como tripanossomíase americana, é o resultado da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* — *T. cruzi*. Acredita-se que esta afete 6 milhões de pessoas no mundo e cause 12 mil óbitos anuais. A doença é dividida em duas partes, a fase aguda e a fase crônica. Assim que infectada, a pessoa desenvolve a fase aguda, que geralmente é assintomática ou possui sintomas comuns, como: mal-estar, dor de cabeça e febre. Pela falta de sintomas específicos que alertem para a doença, o indivíduo afetado não procura ajuda e como consequência avançará para a fase crônica. Nesta, a pessoa pode desenvolver sérios problemas cardíacos e/ou digestivos, que são ameaças gravíssimas à vida do indivíduo. Ainda que seja uma doença extremamente grave, apenas um remédio é disponível no Brasil e na maioria da América Latina, o benznidazol. Este medicamento funciona bem apenas se utilizado na fase aguda, porém raramente a doença é descoberta nessa fase; além de ter muitos efeitos colaterais. Por isso existem vários estudos que pesquisam novas possibilidades de remédios para a doença de Chagas, e este é um deles. Em um trabalho anterior do nosso laboratório, vimos que dois possíveis medicamentos tiveram ótimos resultados. Por isso, neste estudo selecionamos estes medicamentos (chamados de 3a e 3b), e avaliamos seus efeitos sobre o protozoário (*T. cruzi*) e sobre células animais. Nossos resultados mostraram que estes medicamentos conseguem eliminar os protozoários sem serem tóxicos para as células animais. Indicando assim que estes são extremamente interessantes quando se pensa na busca por um novo tratamento para doença de Chagas e outras doenças também causadas por protozoários.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *T. cruzi*, protozoário, medicamentos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BZN- Benznidazol

Cu- Cobre

Co- Cobalto

CCC- Cardiomiopatia Chagásica Crônica

CC₅₀- Concentração Citotóxica para 50% da população celular

DMEM- Meio Eagle modificado por Dubelco

DMSO- Dimetilsulfóxido

DL₅₀- Dose Letal para 50% das células

FCCP- carbonilcianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona

EUA- Estado Unidos da América

IA- Índice de Associação

IC₅₀- Concentração inibitória de 50% do crescimento

K- Cinetoplasto

MG- Minas Gerais

Mn- Manganês

MTT- Dimetiltiazoldifenil brometo tetrazólico

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Ni- Níquel

OPAS/ PAHO- Organização Pan Americana de Saúde

OMS- Organização Mundial de Saúde

pH- Potencial de hidrogênio

PBS- Tampão fosfato-salina

RJ- Rio de Janeiro

RPM- Rotações por minuto

SC- Santa Catarina

SFB- Soro fetal bovino

USD- Dólares Americanos

Zn- Zinco

$\Delta\Psi_m$ - Potencial elétrico transmembrana mitocondrial

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	III
DEDICATÓRIA	VI
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
RESUMO PARA LEIGOS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
ÍNDICE	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DESCOBRIMENTO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DA DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	2
1.3. CICLO DE VIDA E ROTAS DE TRANSMISSÃO	4
1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS	7
1.4.1. FASE AGUDA	8
1.4.2. FASE CRÔNICA	9
1.5. EPIDEMIOLOGIA	10
1.6. TRATAMENTO ETIOLÓGICO	11
1.7. COMPLEXOS METÁLICOS	11
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. PARASITOS	17
4.2. CULTIVO CELULAR	17
4.3. OBTENÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA	17
4.4. COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS	18
4.5. EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL DO PARASITO	18
4.6. EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE POTENCIAL ELÉTRICO TRANSMEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)	18
4.7. EFEITOS DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS EPITELIAIS LLC-MK ₂	19

4.8. EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE AMASTIGOTAS INTRACELULARES.....	20
4.9. ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	21
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	21
5. RESULTADOS	22
5.1. EFEITOS DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE O METABOLISMO MITOCONDRIAL DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	22
5.2 EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE O POTENCIAL ELÉTRICO DE TRANSMEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)	22
5.3. EFEITO CITOTÓXICOS DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOB CÉLULAS EPITELIAIS	24
5.4. EFEITO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE AMINOPIRIDINAS SOBRE A INTERAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS COM CÉLULAS EPITELIAIS	26
5.5. ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	27
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES	33
8. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descobrimto do *Trypanosoma cruzi* e da Doença de Chagas

Em 1903, o médico recém formado, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas foi escolhido por Oswaldo Cruz para trabalhar na pesquisa de controle vetorial da malária, durante a criação da estrada de ferro “Central do Brasil”, em Minas Gerais (MG). Para acompanhar a evolução desta doença, em 1907, Carlos Chagas passa a morar no município de Lassance, onde era construída uma estação da estrada de ferro (Lidani *et al*, 2019). Além da malária, Chagas também pesquisava o ecossistema do local, e em 1908 analisando um sagui, encontrou, descreveu e nomeou o seu primeiro tripanosomatídeo, o *Trypanosoma minasensi*. Neste mesmo ano, ao viajar a Pirapora (MG), Chagas foi introduzido à um inseto extremamente comum na região, o percevejo hematófago conhecido pela população como barbeiro; este inseto foi denominado desta maneira, uma vez que tem o costume de picar o rosto de suas vítimas enquanto dormem.

Por se interessar pelo inseto, Carlos Chagas passou a investigá-lo, e em seu intestino encontrou microrganismos flagelados. Afim de esclarecer se aquele parasito seria natural do inseto ou uma fase evolutiva de outro parasito (como o *T. minasensi*), alguns barbeiros foram enviados a Manguinhos, no Rio de Janeiro (RJ), onde Oswaldo Cruz os utilizou para infectar saguis de laboratório. Posterior a aproximadamente um mês de experimentos, uma cobaia adoeceu, e no sangue periférico desta foi possível detectar muitos tripanosomatídeos. Por fim, ao chegar em Manguinhos, Carlos Chagas percebeu que se tratava de uma espécie nova, e em homenagem à Oswaldo Cruz, a batizou de *Trypanosoma cruzi* (Kropf, 2017). Ainda em Manguinhos, Chagas estudou o ciclo evolutivo deste parasito, concluindo que este poderia infectar outros mamíferos, além do sagui. Considerando estes resultados e sabendo que o barbeiro apresentava preferência por ambientes habitados por humanos, Carlos passou a questionar se o parasito também infectava humanos, e qual seria o quadro clínico desta infecção. Com esta indagação em mente, ele retorna a Lassance, onde passa a buscar na população local, indivíduos possivelmente acometidos pelo *T. cruzi*. Eis que em 14 de abril de 1909, Berenice (de apenas 2 anos) (**Fig. 1**) é examinada por Carlos Chagas. Ela havia sido picada pelo barbeiro, e apresentava febre alta, hepatoesplenomegalia e edema facial; sintomas estes que coincidiam com aqueles vistos em laboratório. Enfim o sangue da paciente foi analisando, onde pode-se notar a presença do *T. cruzi*, o que a tornou o primeiro caso descrito de doença de Chagas (Chagas, 1909; Lidani *et al*, 2019; Chao, Leone e Vigliano, 2020).



Figura 1. A primeira paciente com doença de Chagas descrita. **A.** Berenice quando criança. **B.** Jornal local informando a história de Berenice (Adaptado de Lidani *et al.*, 2019)

1.2. *Trypanosoma cruzi*

Protozoários são um grupo de microrganismos pertencentes ao domínio Eukarya, pois assim como os fungos e animais, eles possuem uma organização mais complexa e apresentam um núcleo celular cercado por membrana. Este grupo de microrganismos é constituído por mais de 60.000 espécies conhecidas, e dentre estas encontra-se a família Trypanosomatidae, que por sua vez abrange diversos gêneros, como por exemplo *Leishmania* e *Trypanosoma*. É neste último que se encontra o parasito *T. cruzi* (Votýpka *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2016). O *T. cruzi* possui algumas organelas especializadas (**Fig.2**), como por exemplo: o glicosossomo, uma organela vital para que ocorra a respiração celular, uma vez que é onde ocorre a maior parte da via glicolítica. Além dele também há o acidocalciossomo, que por sua vez, age regulando o pH celular e armazenando cálcio, nutriente fundamental para o funcionamento celular. Diferente das mencionadas previamente, para o *T. cruzi*, o flagelo é a única organela responsável pela locomoção, esta é composta por nove pares de microtúbulos periféricos que envolvem um par central, e se encontra emergindo da bolsa flagelar (Souza, 2002; Souza, 2009). Diferentes das células de mamíferos que podem possuir centenas ou até milhares de mitocôndrias por célula, os parasitos patogênicos apenas possuem uma única mitocôndria, que é ramificada e pode se prolongar por todo o corpo celular; esta organela possui papéis fundamentais na bioenergética, biosíntese e metabolismo celular, além de ter envolvimento com a regulação apoptótica. Portanto esta organela é indispensável para o funcionamento celular (Fidalgo e Gille, 2011).

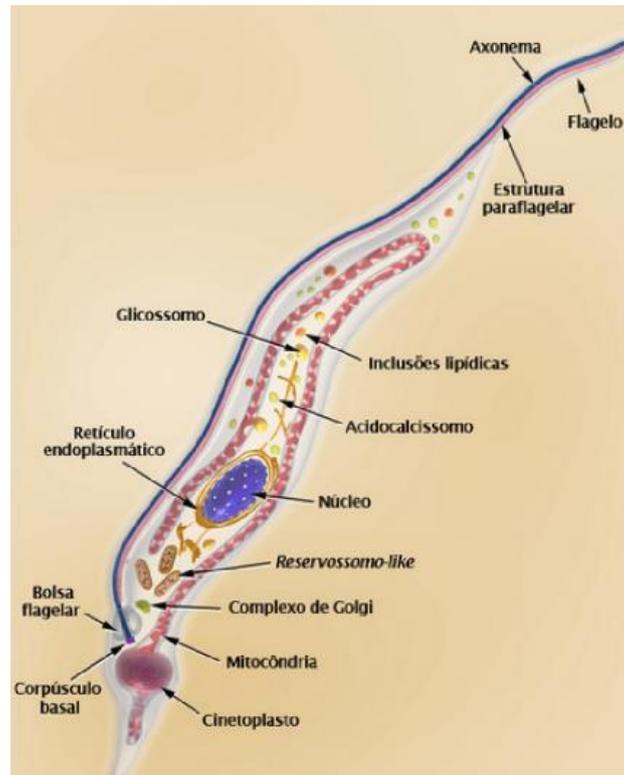


Figura 2. Organização orgânica do *Trypanosoma cruzi*, forma mastigota (Adaptado de Tezuka, 2015)

Dentre as diversas características notáveis do *T. cruzi*, uma das principais é o seu ciclo de vida. Este é heteroxênico pois infecta duas classes de hospedeiros, os invertebrados e os vertebrados, e nestas ele poderá ser encontrado nas formas epimastigotas (**Fig. 3-A**), tripomastigotas (**Fig. 3-B**) ou amastigota (**Fig. 3-C**). Estes estágios podem ser diferenciados através da morfologia e a posição relativa de algumas organelas. Os amastigotas por exemplo, são arredondados e o flagelo é pouco desenvolvido, e sequer emerge da bolsa flagelar. Já as demais formas são diferenciadas pelo formato e posição de organelas como o cinetoplasto, enquanto que epimastigotas possuem esta organela em formato de bastão próximo ao núcleo; as formas tripomastigotas apresentam um cinetoplasto arredondado e na região posterior do parasito (Souza, 2009).

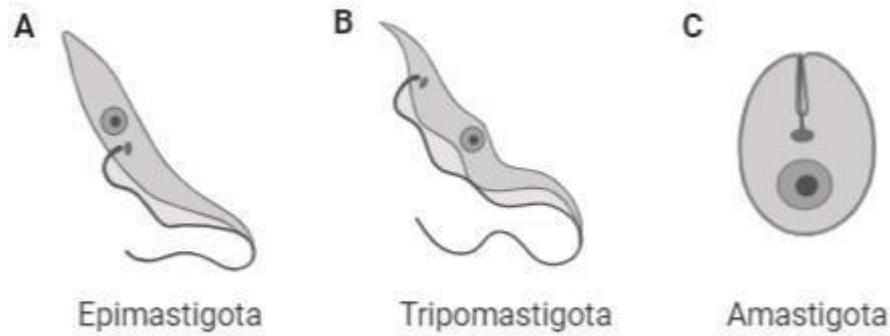


Figura 3. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. **A.** Forma epimastigota. **B.** Forma tripomastigota. **C.** Forma amastigota. (Fonte: BioRender).

1.3. Ciclo de vida e rotas de transmissão

O ciclo do parasito (**Fig. 4**) no hospedeiro invertebrado tem início quando o inseto (vetor), realiza o hematofagismo em um mamífero infectado, e ao ingerir os tripomastigotas sanguíneos, estes irão se diferenciar ao longo do trato digestivo do inseto. Tal transformação irá resultar em epimastigotas e em esferomastigotas (forma intermediária), este último é responsável pela manutenção da infecção, uma vez que pode se transformar em epimastigotas curtos, tornando possível a multiplicação (por divisão binária) e a transformação em tripomastigotas metacíclicos na ampola retal, a porção final do intestino do vetor. Quando a forma tripomastigota metacíclica passa a ser encontrada nas fezes e urina do inseto, significa que este pode dar continuidade ao ciclo da doença de Chagas, através da transmissão vetorial. A forma tripomastigota é conhecida por ser infecciosa para hospedeiros vertebrados, como os humanos; quando em contato com mucosas ou lesões, irá invadir o organismo, e por ser altamente infecciosa, possui a capacidade de penetrar qualquer célula. Assim que estiver dentro da célula hospedeira, consegue evadir a vesícula endocítica e ir para o citoplasma celular, onde irá se diferenciar em amastigota, o que permitirá sua multiplicação (por divisão binária); ao final do processo de multiplicação, as formas amastigotas começam a se converter em tripomastigotas sanguíneos, estes irão romper a célula hospedeira sendo liberados na corrente sanguínea, permitindo a infecção de novas células ou de vetores não infectados durante novo repasto sanguíneo (Neves, 2016; Azambuja e Garcia, 2017).

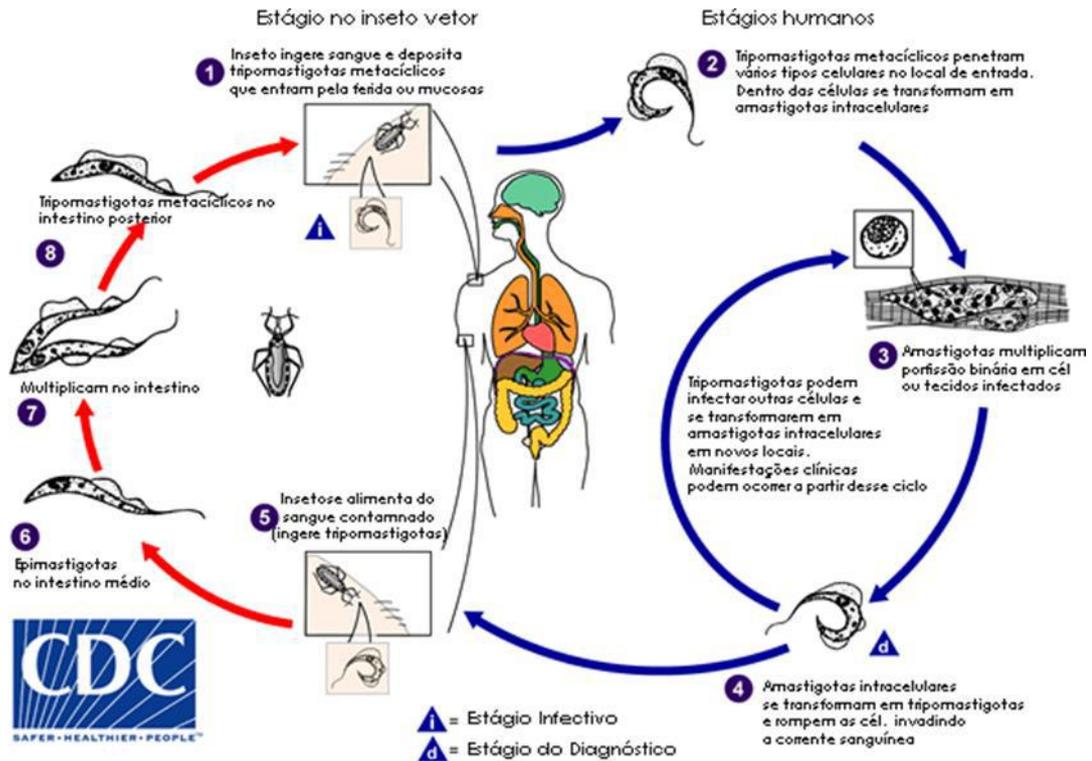


Figura 4. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Adaptado de CDC, 2019)

As formas de transmissão do *T. cruzi* são diversificadas e podem ser classificadas em primárias e secundárias. Mecanismos primários ocorrem com mais frequência, sendo estes as transmissões vetoriais, por transfusões sanguíneas, orais e congênitas. Entretanto também existem as formas pouco tradicionais de transmissão, sendo estas através de contato sexual, transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, etc. Nos dias de hoje, alguns meios de contágio mencionados raramente são vistos, devido aos inúmeros avanços tecnológicos presenciados nas últimas décadas; portanto por serem mais comuns, serão unicamente abrangidos os mecanismos primários de transmissão (Corassa *et al*, 2016).

A rota clássica, mencionada anteriormente, ocorre por intermédio dos insetos da subfamília *Triatominae*, onde mais de 140 espécies possuem a capacidade de transmitir o parasito, dentre estas, 52 são encontradas no Brasil. Contudo, poucas destas espécies possuem relevância epidemiológica, já que a maioria não se encontra presente no ambiente doméstico. Considerando as espécies que possuem significância (epidemiologicamente), a *Triatoma infestans* (Fig. 5) se destaca, uma vez que possui hábitos exclusivamente domésticos, alto índice de infecção e grande eficácia de infestação. (Corassa *et al*, 2016; Chao, Leone e Vigliano, 2020).



Figura 5. *Triatoma infestans* (Adaptado de Juberg *et al*, 2014).

Primariamente a infecção pelo parasito era exclusivamente silvestre, porém conforme a população ia invadindo as matas, os casos passaram a ser comumente vistos em humanos, gerando a ilustre Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase Americana. Desde sua descoberta, em 1909, os casos de doença de Chagas eram exclusivamente vistos em regiões rurais, já que a manutenção do ciclo parasitário requer reservatórios naturais (mamíferos), como marsupiais, primatas e roedores. Todavia, em 1950 iniciou-se “êxodo rural”, na mesma época a hemoterapia começou a ser popularizada, entretanto não havia testagem do sangue doado, e grande parte da população urbana havia migrado de regiões endêmicas para doença de Chagas, gerando assim a transmissão sanguínea, uma nova forma de disseminação do *T. cruzi* (Junqueira *et al*, 2005). Em 1988 a legislação brasileira começou a controlar os bancos de sangue, por intermédio de testes de alta sensibilidade, e registros dos doadores de sangue. Finalmente em 2006, o Brasil obteve o certificado de interrupção da transmissão de doença de Chagas sanguínea e vetorial (pelo *T. infestans*), da Organização Pan Americana da Saúde (OPAS). Entretanto ainda que seja uma conquista no caminho certo, continuam existindo centenas de outras espécies de barbeiros, capazes de transmitir a doença de Chagas, além das novas formas de transmissão encontradas atualmente (Corassa *et al*, 2016; Lidani *et al*, 2019; Chao, Leone e Vigliano, 2020).

A transmissão vertical, ou congênita, ocorre quando a gestante é portadora da doença de Chagas e acaba infectando o feto, este contágio pode acontecer em qualquer momento da gestação. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mundialmente 1,124,930 mulheres na faixa etária reprodutiva (entre 15 e 44 anos) estejam infectadas com *T. cruzi* (OMS, 2015). A transmissão vertical da doença de Chagas no Brasil, ocorre em aproximadamente 1% dos recém nascidos, para isto alguns fatores são importantes, como o nível de parasitemia, a idade, e a resposta imunológica da mãe, assim como a cepa do microrganismo. Ainda que a maioria dos casos sejam assintomáticos, ou possuam sintomas

prodrômicos, é possível observar casos que progridem para abortos, natimortos ou partos prematuros, neste último grupo, observa-se o baixo peso (1,5- 2 Kg) dos recém nascidos, categorizado como um risco para neonatos (Corassa *et al*, 2016; Neves *et al*, 2016).

Com as medidas preventivas de controle vetorial e infecção sanguínea vistas nas últimas décadas, uma nova forma de contágio emergiu, a transmissão oral. Esta consiste na alimentação com mantimentos contaminados pelo *T. cruzi*; a contaminação pode ocorrer através da presença de fezes ou de triatomíneos infectados nos alimentos, que ao serem macerados, acabam contaminados pelo parasito. Através do tecido mucoso, o parasito (na forma infectiva) consegue invadir o organismo do indivíduo, estabelecendo assim a doença de Chagas. Os alimentos que acabam por ser contaminados são o açaí e a cana-de-açúcar, iguarias extremamente famosas em território nacional, facilitando a propagação do parasito (Lidani *et al*, 2019). Diferentemente das outras formas de contágio, a transmissão oral raramente é individual, já que os parasitos são diluídos no alimento, e conseqüentemente podem infectar múltiplas pessoas (Lidani *et al*, 2019). O controle desta transmissão é feito através da higienização e pasteurização (quando possível) destes alimentos, contudo estas medidas preventivas são pouco difundidas popularmente, tornando dificultoso o controle desta transmissão e, portanto, não permitindo a erradicação da doença de Chagas no Brasil.

1.4. Manifestações clínicas da Doença de Chagas

Ao passo em que algumas doenças geram comoção global, outras são pouco vistas. Este caso das doenças negligenciadas, um grupo que afeta predominantemente áreas de pobreza extrema e condições de vida precárias, onde não há acesso aos direitos básicos do ser humano, como saúde, higiene e saneamento. Este grupo de doenças pode mudar conforme a região estudada, entretanto no Brasil os nomes mais comuns são dengue, hanseníase, malária, leishmaniose e doença de Chagas. Estas consideradas doenças tropicais, são alguns exemplos das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro (Valverde, 2013). Uma das características de doenças negligenciadas, é a falta de investimento em pesquisas que visam buscar novas medidas de contenção do vetor e/ou tratamento para as patologias causadas pelas infecções. Esta mazela é ocasionada após a infecção de um indivíduo pelo protozoário *T. cruzi*. O quadro clínico desta doença é dividido em duas fases, a primeira é a fase aguda, que caso se manifeste, será vista em até 15 dias após a infecção, posteriormente haverá a fase crônica, que por sua vez, pode demorar anos para aparecer.

1.4.1. Fase aguda

A primeira fase de manifestação da doença de Chagas é predominantemente assintomática, pois estima-se que 60-70% dos indivíduos infectados não apresentarão nenhumsintoma. Entretanto os demais pacientes apresentarão sintomas, e estes podem ser prodrômicos como, dores de cabeça, febre prolongada, mal-estar, e em alguns casos edemas (localizados e generalizados); estes sintomas tendem aparecer de 5 a 14 dias após a infecção. Todavia sintomas patognomônicos podem aparecer, tais como, o “Sinal de Romanã” (**Fig. 6- A e B**) que ocorre em 10% a 20% dos casos, este é um edema inflamatório bipapalbral unilateral, derivado do contato da mucosa ocular com as fezes contaminadas do vetor; já o chagoma de inoculação (**Fig. 6- C e D**) é um inchaço cutâneo localizado, observado no local da picada devido a contaminação com as fezes do vetor; contudo, ainda que seja um sintoma clássico da fase aguda de doença de Chagas, pode ser facilmente ignorado pelo indivíduo. Desta forma, a falta de sintomas (específicos ou generalizados), faz com que o indivíduo não busque tratamento e conseqüentemente avance para a fase crônica da doença. Entretanto em alguns casos da fase aguda, pode-se haver manifestações fatais, em especial se ela ocorrer na primeira infância, onde há morte em 10% dos casos, principalmente por inflamações, em geral das meninges (gerando meningoencefalite), e raras vezes, do tecido cardíaco, este último leva à miocardite aguda difusa (Neves *et. al*, 2016; Lidani *et al*, 2019).

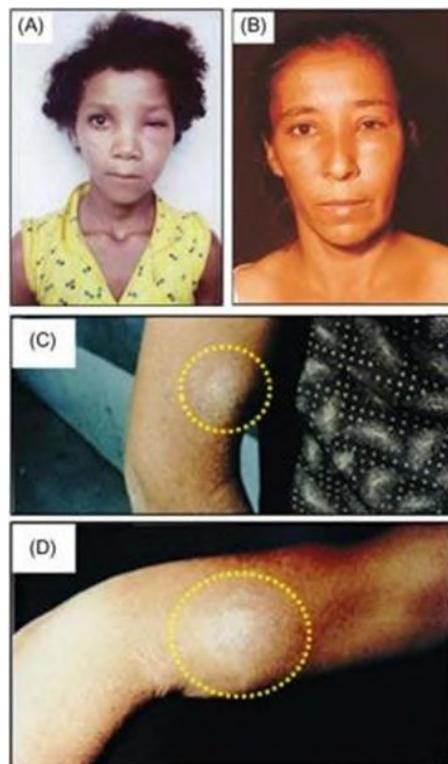


Figura 6. Sintomas característicos da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*; **A e B.** Sinal de Romanã. **C e D.** Chagoma de inoculação (delimitado pelo círculo) (Adaptado de Telleria e Tibayrenc, 2017).

1.4.2. Fase Crônica

É durante esta fase que usualmente o paciente descobre que possui a doença de Chagas, no entanto ela pode aparecer de 10 a 40 anos após a infecção, e da mesma forma que a anterior, esta fase será majoritariamente assintomática, chamada de forma indeterminada, caracterizada pela positividade de exames parasitológicos e/ou sorológicos, entretanto sem apresentar nenhum sintoma de doença de Chagas crônica ou alterações no eletrocardiograma do indivíduo. Porém 40% dos casos são sintomáticos, e estes pacientes podem ter diferentes formas da doença, como a forma digestiva, que ocorre quando o indivíduo desenvolve megacólon (**Fig. 7- C**) e/ou megaesôfago (**Fig. 7- B**), gerando alterações morfológicas e principalmente motoras, atrapalhando a peristalse do trato digestivo. Contudo, a forma mais severa afeta 1/3 dos pacientes chagásicos, fazendo-os desenvolver cardiomiopatia crônica chagásica (CCC) (**Fig. 7-A**), esta é responsável por induzir a insuficiência cardíaca através da fibrose do músculo. Geralmente o indivíduo sintomático apresentará apenas uma forma da doença, podendo ser cardíaca ou digestiva, entretanto alguns pacientes podem manifestar ambas simultaneamente, sendo conhecida como a forma mista da doença de Chagas (Neves *et. al*, 2016; Lidani *et al*, 2019).

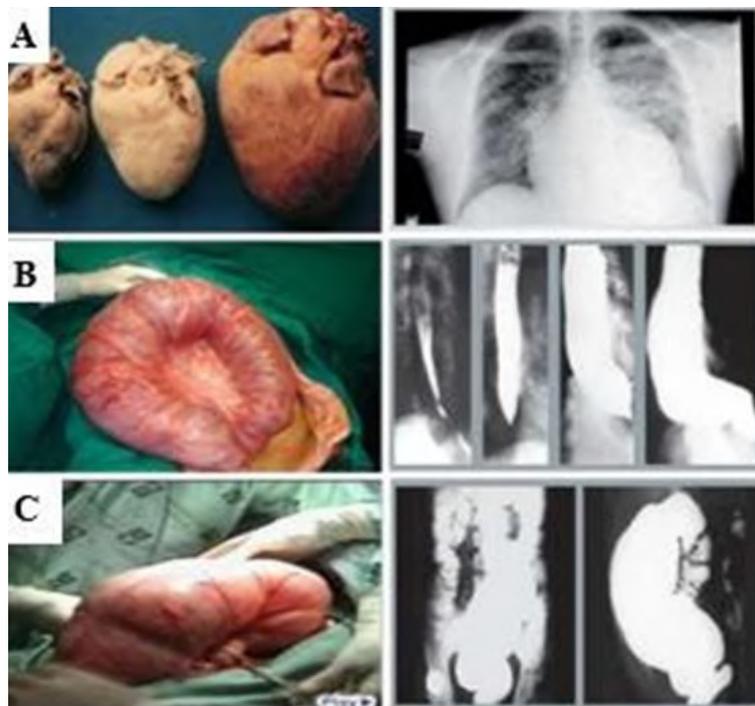


Figura 7. Manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas. **A.** Comprometimento cardíaco. **B.** Megaesôfago. **C.** Megacólon (Adaptado de Silva *et al*, 2006; Rassi *et al*, 2010 *apud* Sangenito, 2015).

1.5. Epidemiologia

Embora seja endêmica em 21 países, incluindo o Brasil, a doença de Chagas ainda faz parte das doenças negligenciadas, sendo categorizada como extremamente negligenciada, pois estima-se que na última década, esta enfermidade recebeu menos de 1% do investimento para pesquisas de doenças negligenciadas (Sangenito, Branquinha e Santos, 2020). O fator endêmico deste quadro se dá pela tropicalidade do país afetado, uma vez que os insetos vetores (triatomíneos) vivem em climas mais quentes. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas vivam em áreas de risco para a doença de Chagas, e que esta afete 6 milhões de pessoas mundialmente, possuindo anualmente, incidência de 30 mil casos e 12 mil mortes, principalmente em países endêmicos (PAHO). Calcula-se que a prevalência desta enfermidade no Brasil seja de 1 à 2,4% da população, o equivalente de 1,9 à 4,6 milhões de cidadãos brasileiros; além de ser categorizada como uma das quatro maiores causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias no país (Ministério da Saúde, 2020). Todavia é possível observar casos de doença de Chagas fora dos países endêmicos (**Fig. 8**), como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Espanha, Austrália e etc. (Lidani *et al*, 2019). Estes casos são importados, vistos predominantemente em imigrantes de países endêmicos, e ainda que sejam uma pequena porcentagem, geram grandes despesas para os governos, desta maneira calcula-se que, o impacto econômico mundial desta enfermidade seja estimado em mais 7 bilhões de dólares americanos (USD) (Francisco *et al*, 2020).

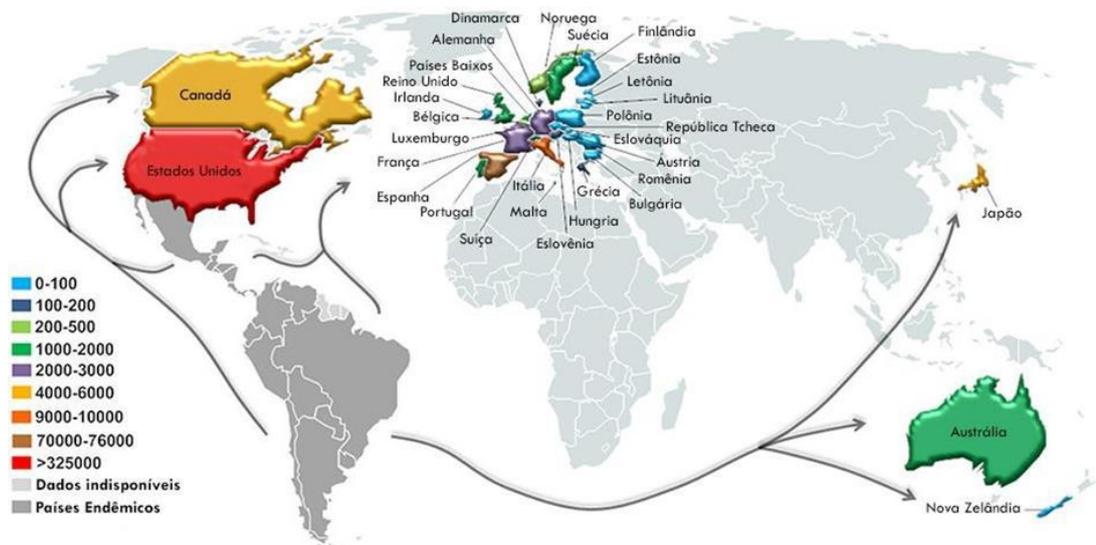


Figura 8. Mapa epidemiológico da doença de Chagas com número estimado de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em países não endêmicos (Adaptado de Lidani *et al*, 2019).

1.6. Tratamento etiológico

Apesar de ser uma doença altamente incapacitante, possui somente dois medicamentos disponíveis mundialmente, sendo estes Benznidazol (BZN) e Nifurtimox, respectivamente a primeira e segunda linha de tratamento para a doença de Chagas. Ambos compostos agem após sua redução por nitrorredutases parasitárias, permitindo a interação letal dos metabólitos com proteínas e até com o DNA parasitário (Wishart *et al*, 2018). No Brasil, apenas o BZN é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), consequentemente sendo o único tratamento utilizado nacionalmente. Este medicamento foi originalmente produzido pela companhia privada Roche, contudo a partir de 2008 passou a ser produzido pelo governo brasileiro, porém sua matéria prima ainda é produzida por empresas privadas, aumentando assim o custo do tratamento (Pinheiro *et al*, 2017). A eficácia deste tratamento é regular, porém o surgimento de cepas resistentes está mudando esse cenário; Por exemplo, em Minas Gerais, 8 estirpes de *T. cruzi* foram isoladas de casos clínicos, das quais, 7 se mostraram naturalmente resistentes ao BZN em ambas fases da doença, e uma se mostrou suscetível apenas na fase aguda (Oliveira- Silva *et al*, 2014). Desta forma, o tratamento só se mostrará efetivo, quando aplicado na primeira fase da doença, porém raramente a doença de Chagas é descoberta neste período, o que muitas vezes impossibilita a cura do indivíduo. Além disso o tratamento também gera uma gama de efeitos colaterais, que afetam com maior frequência pacientes mais velhos, o que pode induzir a interrupção do tratamento precocemente (Viotti *et al*, 2009).

1.7. Complexos metálicos

Há séculos os metais são utilizados na medicina de diferentes formas, principalmente como suplementação, isto ocorre, pois alguns metais são considerados essenciais para o funcionamento de organismos eucarióticos, já que as células dependem destes metais para respirar, carregar proteínas, etc. Estes, podem ser divididos em elementos orgânicos, macro minerais e vestigiais, o último se refere aos elementos que são necessitados em poucas quantidades (Zoroddu *et al*, 2019). Porém na última década o número de aplicações dos complexos metálicos na medicina cresceu, sendo recentemente utilizados como agentes antitumorais, anticancerígenos e antimicrobianos. Dentre os metais interessantes para aplicação como agentes antimicrobianos, se destacam os essenciais, tais como manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn) e cobalto (Co); entretanto outros metais não-essenciais também podem ser empregados, como a prata (Ag) e níquel (Ni). Estes metais quando complexados aos compostos, possuem capacidades bactericidas, fungicidas e antiparasitárias impressionantes;

como exemplo, ao revestirem insumos hospitalares com cobre e prata, foram vistas reduções extremamente significativas na viabilidade celular bacteriana (Turner, 2017). O mesmo foi visto em fungos de importância nosocomial (complexo *Candida haemulonii*), que são conhecidos por serem resistentes a maioria dos antifúngicos utilizados; ao unirem Cu(II), Mn(II) e Ag(I) à ligantes de Phen e Phendiona (inibidores de proteases), criaram compostos capazes de inibir crescimento fúngico (de biofilme e planctônico) de algumas espécies deste complexo. Contudo, os sais simples destes metais não apresentaram efeitos significativos sobre os microrganismos, mostrando que a efetividade está no complexo metálico (Gandra *et al*, 2017). Tudo isto ocorre, pois os íons metálicos ligados aos compostos são agentes quelantes, portanto ao interagirem com as células microbianas, alteram sua hidrossolubilidade. Cada composto metálico afetará os microrganismos de maneira diferente, portanto dependendo da espécie, alguns complexos metálicos serão mais efetivos do que outros (Lemire, Harrison e Turner, 2013). Compostos complexados à paládio foram evidenciados como bons agentes anti- *T. cruzi*, entretanto este metal não é essencial, o que possivelmente dificultaria um tratamento a longo prazo (Mosquillo *et al*, 2018). Contudo, outros estudos mostraram o uso de metais essenciais como agentes anti-*T. cruzi*; um em especial utilizou um composto, complexado a cobre, que foi capaz de reduzir a parasitemia de animais infectados em 64% (Paixão *et al*, 2019). Desta forma os compostos associados a Cu(II) possuem efeitos anti-parasitários, especialmente contra *T. cruzi*, pois o cobre (em baixas quantidades) tem a capacidade de se ligar a receptores específicos do parasito, permitindo a entrega do tratamento diretamente ao protozoário (Martins *et al*, 2016). Além disso, o cobre é um metal essencial, portanto pode ser utilizado em tratamento, desde que seja em concentrações abaixo de 1,5 mg/L (Zoroddu *et al*, 2019; Barceloux e Barceloux, 1999). Ademais a estes fatores, outro composto químico amplamente utilizado na indústria farmacêutica também detém grande potencial como agente antimicrobiano, estas são as aminopiridinas. O estudo farmacológico desta molécula é datado desde 1924, onde foi mencionado suas atividades vasopressoras, isto é pois as aminopiridinas bloqueiam os canais de potássio, sendo por muitos anos aplicadas em tratamentos de doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla e até Alzheimer, entretanto caso associadas aos componentes certos, como os metais essenciais, podem ser direcionadas à células microbianas, para então agirem como agentes antimicrobianos (Soni e Kam, 1982; NCBI, 2020).

Com base nestas informações o grupo do laboratório produziu um trabalho que visava testar compostos derivados de imino e aminopiridina, associados à zinco ou cobre, sobre os

protozoários *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*; por fim notou-se que os compostos com zinco possuíam mais efeito sobre a *L. amazonensis*, e as metalodrogas com cobre eram mais efetivas sobre o *T. cruzi*. Ainda neste trabalho, os compostos derivados de aminopiridinas **3a** [L112 CuCl₂(ClO₄)₂] (**Fig. 9- A**) e **3b** (AGL 112 CuCl₂) (**Fig. 9- B**), chamaram atenção por serem mais efetivos que o próprio BZN, uma vez que ambos possuem DL₅₀ de respectivamente, 1,7 μM e 1,8 μM, sendo inferiores à metade daquele visto no benznidazol (DL₅₀= 3,8 μM). Além deste fator, também apresentaram efeitos sob a morfologia do *T. cruzi* que possivelmente impeçam futuras infecções, como por exemplo, encolhimento ou perda do flagelo celular, arredondamento e diminuição do tamanho celular, etc. Além disso, outro fato interessante foi os compostos apresentarem baixa toxicidade para o organismo hospedeiro. Isso foi observado em ensaios *in vitro* com macrófagos murinos RAW, onde a concentração mínima inibitória para a metade da população celular (CC₅₀), foi para **3a** e **3b**, respectivamente, de 106,2 μM e 127,6 μM. Consequentemente os índices de seletividade destes compostos para os macrófagos RAW foram altos — 62,5 para o **3a** e 70,9 para o **3b**. Esta baixa toxicidade também foi observada em ensaios *in vivo* com larvas de *Galleria Mellonella* — modelo este que mimetiza a resposta imune inata humana. A resposta imune das larvas é realizada através da melanização, no entanto todas as larvas tratadas com os compostos (em diferentes concentrações) por 24 e 48h, sobreviveram e em nenhuma foi vista melanização, indicando que não houve ativação do sistema imune (Reddy *et al*, 2017).

Portanto, devido à comprovação de efetividade e baixa citotoxicidade de ambos compostos, este foram selecionados para serem investigados no presente trabalho.

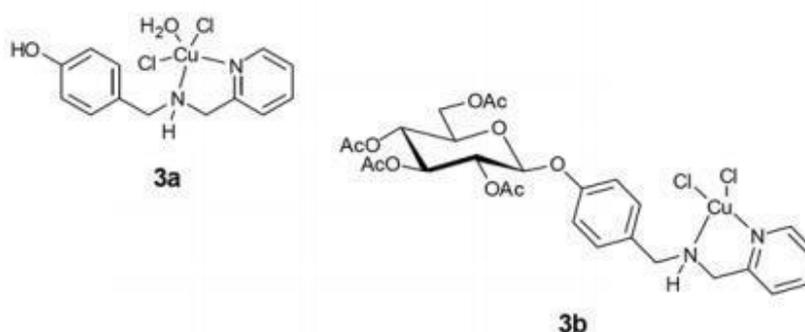


Figura 9. Estrutura química dos ligantes de aminopiridinas conjugados aos complexos metálicos. **3a.** Composto L112 CuCl₂(ClO₄)₂. **3b.** Composto AGL 112 CuCl₂ (Adaptado de Reddy *et al*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

T. cruzi é o agente causador da doença de Chagas, esta por sua vez é responsável por aproximadamente 12 mil mortes por ano (PAHO). Todavia o tratamento disponível está longe de ser ideal, pois além de ser caro para produzir, também possui baixa eficácia e múltiplos efeitos colaterais. Tornando-se extremamente necessária a pesquisa por novas alternativas de tratamento, que sejam mais baratas, eficazes e apresentem poucos efeitos colaterais (Pinheiro *et al*, 2017)

Na última década, as metalodrogas surgiram como uma ótima opção de tratamento, já que a presença dos íons metálicos aumentam a especificidade do composto, desta forma diminuindo as quantidades necessárias para tratamento (Lemire, Harrison e Turner, 2013; Gandra *et al*, 2017). Nesse contexto, resultados recentes do nosso grupo apontam que derivados de aminopiridina complexados a Cu^{2+} são efetivos contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Reddy *et al*, 2017). Por fim, além destes compostos serem fáceis de sintetizar e possuírem baixo custo de produção, os dados apresentados evidenciam que os derivados metálicos de aminopiridinas detêm grande potencial. No entanto, necessitamos saber se a única mitocôndria do parasito é um alvo para estes compostos, além de verificar o efeito sobre as formas amastigotas, estágio intracelular replicativo responsável pelo desenvolvimento e manutenção de infecções por *T. Cruzi*.

3. OBJETIVOS

Este trabalho pretende investigar os efeitos *in vitro* dos quelantes metálicos 3a [L112 $\text{CuCl}_2(\text{ClO}_4)_2$] e 3b [AGL 112 CuCl_2], sobre a fisiologia e processo de interação do *Trypanosoma cruzi*.

- Analisar o efeito dos compostos sob o metabolismo mitocondrial do parasito;
- Avaliar o efeito dos compostos sob o potencial de membrana mitocondrial;
- Analisar se os compostos apresentam toxicidade para as células hospedeiras LLC-MK₂;
- Investigar o efeito dos compostos sobre a interação do parasito com as células hospedeiras;
- Determinar o índice de seletividade dos compostos;

4. METODOLOGIA

4.1. Parasitos

Neste trabalho foram utilizadas as formas tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi*. Esta cepa foi isolada de um indivíduo humano apresentando um quadro agudo de Doença de Chagas, 1950, em Marília, município do estado de São Paulo (Silva e Nussenzweig, 1953 apud Sangenito, 2015).

4.2. Cultivo celular

As células LLC-MK₂ (células epiteliais retiradas do rim de macacos Rhesus) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm² e nutridos com o meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dubelco) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. A manutenção das células foi feita através de repiques realizados a cada 96h, onde o meio preexistente foi removido e as células lavadas com DMEM puro, que também foi descartado; em seguida incubou-se a garrafa com solução de tripsina (2,5 g/l) durante 5 minutos, até que houvesse a soltura das células na garrafa, para inativar esta enzima adicionou-se o dobro de meio suplementado com 10% de SFB, e então as células em suspensão puderam ser transferidas para novas garrafas. Assim como a suspensão de células foram transferida para novas garrafas, estas também foram contadas utilizando solução de azul de tripan (0,4%) e plaqueada na proporção de 10⁵ células por poço em microplacas de 96 poços, ou 5x10⁴ em lamínulas de vidro de 13 mm previamente alocadas em microplacas de 24 poços, em ambos casos havia meio DMEM com 10% de SFB em cada poço. Após 24h os poços foram lavados com DMEM puro para remover quaisquer células não aderidas, para que então as células fossem submetidas à experimentos de viabilidade celular (microplacas de 96 poços) e a experimentos de interação celular (microplacas de 24 poços) (Freshney, 1994; apud Sangenito, 2015).

4.3. Obtenção de tripomastigotas de cultura

As células LLC-MK₂ aderidas à garrafas de 75 cm², foram infectadas com tripomastigotas na proporção 10:1 parasitos-célula epitelial, e mantidas em meio DMEM suplementado com 2% de SFB e incubados à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após 24h os parasitos não internalizados foram removidos pela lavagem com DMEM puro, e o sistema foi novamente nutridos com DMEM suplementado com 2% de SFB. Este meio é recorrentemente renovado a cada 48h até que as formas tripomastigotas fossem liberadas pelas células. Então o sobrenadante com os parasitos foram recolhido, centrifugados à 3500 RPM por 10 minutos,

e incubados à 37°C por 3h para que as formas flageladas (tripomastigotas) nadem até a superfície, separando-se de restos celulares e das formas amastigotas, que ficam sedimentadas (Sangenito *et al*, 2018).

4.4. Compostos derivados de aminopiridinas

Os compostos utilizados no presente trabalho foram fornecidos por Trinidad Velasco- Torrijos, do departamento de química da universidade Maynooth, Irlanda. Estes compostos derivados de aminopiridina, são o 3a [L112CuCl₂(ClO₄)₂] e o 3b (AGL112CuCl₂), a síntese destes juntamente com a dose mínima letal para metade da população parasitária (DL₅₀), foram previamente descritos, se apresentando como 1,7 µM para o composto 3a, e como 1,8 µM para o composto 3b (Reddy *et al*, 2017). Essas concentrações foram utilizadas nos ensaios subsequentes.

4.5. Efeito dos compostos derivados de aminopiridinas sobre o metabolismo mitocondrial do parasito

Este experimento visa identificar possíveis alterações no metabolismo mitocondrial do parasito, para isto as formas tripomastigotas de cultura foram contadas, afim de obter-se 1x10⁶ células por poço, estes então foram tratados por 24h com ambos compostos, nas seguintes concentrações: ½ DL₅₀, DL₅₀ e 2 x DL₅₀. Após o tratamento, as células remanescentes foram contadas novamente, padronizando o experimento com 1x10⁷ células por poço. Por fim, as células tratadas e padronizadas, foram plaqueadas (microplacas de 96 poços) e incubadas por 3h com MTT (dimetiltiazoldifenil brometo tetrazólico) (Mosmann, 1983). Este é um sal que na presença de desidrogenases mitocondriais, é transformado em cristais de formazona que emitem coloração roxa, e são insolúveis em água, portanto a placa foi centrifugada (1500 rpm por 5 minutos) e o seu sobrenadante foi removido. Finalmente os cristais foram diluídos em 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), permitindo assim sua leitura no espectrofotômetro a 570 nm.

4.6. Efeito dos compostos derivados de aminopiridinas sobre potencial elétrico transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Neste experimento analisa-se o $\Delta\Psi_m$ dos parasitos utilizando o fluorocoma JC-1. Este por sua vez é um corante catiónico lipofílico vital que apresenta uma abundância potencial-

dependente na mitocôndria em resposta ao potencial da membrana mitocondrial, estabelecido pela mudança de fluorescência verde (≈ 530 nm) para vermelha (≈ 590 nm). Por conseguinte, a despolarização mitocondrial é determinada pela diminuição na razão (vermelho/verde) da intensidade da fluorescência. A alteração de cor é correspondente à formação dependente da concentração de agregados vermelho fluorescentes (Macedo-Silva *et al*, 2011). Portanto, a fluorescência do JC-1 é tida como um indicador de um estado mitocondrial energizado, podendo ser empregado para medir o $\Delta\Psi_m$ do *T. cruzi*. Para isso as formas tripomastigotas foram tratadas, ou não (controle), com doses únicas dos compostos 3a e 3b em concentrações referentes ao DL_{50} ($\frac{1}{2} \times DL_{50}$, DL_{50} e $2 \times DL_{50}$), por 24h. Posterior a este período, os tripanossomatídeos foram recolhidos, lavados com PBS e ressuspendidos em tampão de reação, que contém sacarose 25 mM, KCl 65 mM, HEPES/K⁺ 10 mM, pH 7,2, Pi 2 mM, MgCl₂ 1 mM e ácido etilenoglicol tetracético (EGTA) 500 μ M. Com o intuito de avaliar o $\Delta\Psi_m$ de cada circunstância experimental, 1×10^6 parasitos foram incubados com 5 μ g/ml 7 de JC-1 durante 40 minutos com leituras feitas a cada minuto em espectrofluorímetro (leitor de microplacas Molecular Devices SpectraMAX Gemini XPS). O controle positivo da despolarização mitocondrial consistiu em um sistema tratado com carbonilcianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) a 1 μ M. Para concluir a reação, foi adicionado em todos os sistemas (incluindo os controles), FCCP na concentração de 2 μ M, com o intuito de anular o $\Delta\Psi_m$ (Macedo-Silva *et al*, 2011). O valor relativo do $\Delta\Psi_m$ foi obtido calculando a proporção entre as leituras a 590 nm e as leituras a 530nm (razão 590/530).

4.7.Efeitos dos compostos derivados de aminopiridinas sobre a viabilidade das células epiteliais LLC-MK₂

Afim de testar a citotoxicidade destes compostos sob as células epiteliais LLC-MK₂, foi realizado o teste de viabilidade celular, que consiste em uma análise da viabilidade mitocondrial destas células, após o tratamento por 24 ou 72 horas. Esta técnica foi feita utilizando o sal MTT (dimetiliazoldifenil brometo tetrazólico) (Mosmann, 1983), e baseia-se na capacidade das células viáveis de produzirem desidrogenases mitocondriais. Para tal, as placas de 96 poços com as 5×10^4 células já pré-aderidas, foram tratadas com concentrações variadas de ambos compostos (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 0 μ M) diluídos em 100 μ L meio DMEM suplementado com 10% de SFB; após 24 horas o MTT é aplicado, deixando-o reagir por 3 horas, então a placa foi centrifugada, os cristais solubilizados em DMSO e lidos no

espectrofotômetro. Após obter, no mínimo, três resultados (cada um em triplicata) coerentes entre si, o CC_{50} de cada composto foi calculado. Além disso, com base nos resultados obtidos após o tratamento de 72h, foram determinadas as concentrações ideais utilizadas no experimentos de interação celular (Santos *et al*, 2009).

4.8.Efeito dos compostos derivados de aminopiridinas sobre amastigotas intracelulares

Nesta abordagem o intuito é visualizar qual o efeito do tratamento com os compostos após a interação da célula animal com o parasito. Assim, após 24 horas de aderência das células LLC-MK₂ nas microplacas de 24 poços, estas foram infectadas com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* em uma concentração de 5×10^5 (porporção de 1:10 de célula animal- parasito) por 3 horas, em meio DMEM com 2% de SFB. Após a infecção, o sobrenadante foi descartado e um novo meio, nas mesmas condições, adicionado juntamente com diferentes concentrações de ambos compostos — como 3.125, 6.25, 12.5 e 25 μ M para o 3a, e 6.25, 12.5, 25, 50 μ M para o 3b — nas quais as interações foram tratada por 72h. Estas foram selecionadas, pois foram as três maiores concentrações que mantiveram ao menos 90% das células hospedeiras viáveis. Após o tratamento o sistema foi fixado e corado, para isto o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram duplamente lavadas com PBS, em seguida fixadas com Bowin por 10 minutos, lavadas 4 vezes com etanol 70% (para remover o Bowin) e incubadas por 24 horas na geladeira. Com as lamínulas fixadas, o etanol foi lavado com água destilada e iniciou-se o processo de coloração com Giemsa diluído e filtrado, esta etapa foi feita na privação de luz, à temperatura ambiente por 40 minutos. Por fim as lamínulas passaram novamente por lavagem com água destilada, para que ocorresse a bateria de descoloração, onde progressivamente substituiu-se acetona por xilol, o que tornou o sistema estável para imobilização em lâminas de vidro utilizando bálsamo do Canadá.

O resultado foi observado através da microscopia óptica de campo claro, onde as lâminas fixadas foram vistas sob a objetiva de 100x; em campos de visão aleatórios foram contabilizadas até 200 células, sendo estas infectadas ou não; no caso das células infectadas, também foi contabilizado o número de amastigotas intracelulares. Com base nestas contagens, determinou-se o valor do Índice de Associação (IA), que além da porcentagem de células infectadas leva também em consideração o número de amastigotas, e baseando-se neste resultado foi calculada através de regressão linear a concentração inibitória para 50%

dos amastigotas (IC₅₀) (De Souza, 2009 *apud* Sangenito, 2015)

$$IA = \% \text{ de células infectadas} \times n^{\circ} \text{ amastigotas} \frac{\text{intracelulares}}{n^{\circ} \text{ de células infectadas}}$$

4.9. Índice de seletividade

Baseando-se nos resultados obtidos através do uso da metodologia anteriormente citada, foi possível determinar o CC₅₀ da célula animal LLC-MK₂. Em adição, com os valores do DL₅₀ (tripomastigotas) e IC₅₀ (amastigotas) calculados, também foi possível determinar os índices de seletividade pelas razões (CC₅₀/DL₅₀, CC₅₀/IC₅₀) desses resultados pelo mesmo tempo (seja 24 ou 72h). Os valores classificados como ótimos são os que apresentam razões iguais ou superiores a 10 para cada composto (Sieveking *et al*, 2014).

4.10. Análises estatísticas

Os experimentos aqui demonstrados foram em sua totalidade, realizados em triplicatas e repetidos por no mínimo três vezes. As análises estatísticas foram feitas com o teste t de student, considerando significativos valores de *P* menores que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos dos compostos derivados de aminopiridinas sobre o metabolismo mitocondrial das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Com a constatação da redução da viabilidade celular dos tripomastigotas, após o tratamento com os compostos (Reddy *et al.*, 2017), foi questionado se alterações no metabolismo mitocondrial do parasito acompanhariam essa redução. Para isto foram utilizadas concentrações referentes ao DL₅₀ (½ DL₅₀, DL₅₀ e 2x DL₅₀) de ambos os compostos — 0.85, 1.7 e 3.4 µM para o composto 3a, e 0.9, 1.8 e 3.6 µM para o composto 3b. O composto 3a apresentou redução significativa na atividade das desidrogenases em todas as concentrações testadas, enquanto que o 3b apenas o fez nas duas maiores (Fig. 10). Nas maiores concentrações utilizadas de cada composto, as reduções chegaram a 56,6% e 50,2%, respectivamente para 3a e 3b.

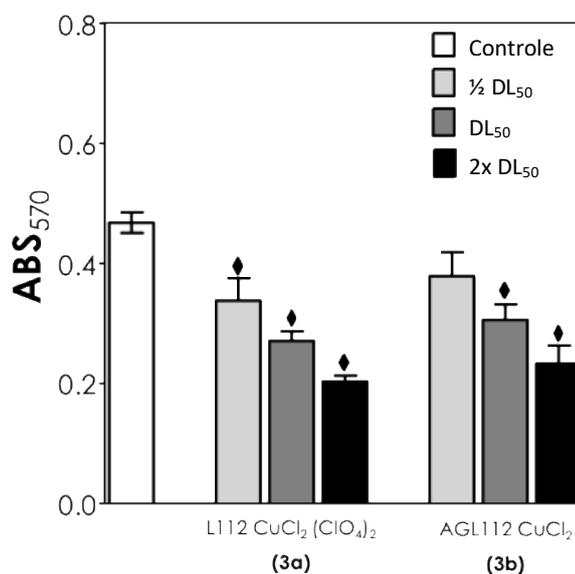


Figura 10. Efeito dos compostos 3a e 3b sobre as desidrogenases. Os tripomastigotas foram incubados na ausência (barra branca), e na presença de diversas concentrações dos compostos selecionados. A análise da atividade das desidrogenases mitocondriais foi realizada por meio do ensaio de MTT, através de espectrofotometria a 570 nm (ABS, absorbância). Os símbolos indicam as diferenças significativas em relação ao controle ($P < 0,05$).

5.2 Efeito dos compostos derivados de aminopiridinas sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O intuito deste experimento é apurar se o tratamento com os compostos (3a e 3b) gerariam despolarização da membrana mitocondrial, sendo observado pelo uso do fluorocromo JC-1. Os tripomastigotas foram tratados por 24h, com os compostos em concentrações de ½xDL₅₀, DL₅₀ e 2xDL₅₀. Para o composto 3a as concentrações foram,

respectivamente, 0.85, 1.7 e 3.4 μM , enquanto que o composto 3b foi, 0.9, 1.8 e 3.6 μM . Posterior a adição do JC-1, a incubação por 30 min mostrou que em ambos os compostos, houve uma redução gradativa da polarização mitocondrial nas três concentrações administradas, enquanto que o controle apresentava estabilidade da polarização (**Fig. 11 A, B**). No composto 3a aos 5 min de leitura, as três concentrações apresentam valores de polarização relativamente altos, entretanto conforme segue a leitura, a queda da polarização das duas maiores concentrações é aguda, tornando-as próximas do controle positivo para despolarização da membrana (**Fig. 11A**). Algo similar é visto no composto 3b, entretanto neste a maior concentração utilizada, parte de um ponto de polarização baixo, e mantém-se relativamente estável em comparação as duas menores concentrações que apresentam quedas, em especial a concentração de DL_{50} que apresenta um caimento íngreme consideravelmente próximo a maior concentração administrada (**Fig. 11B**). Logo conclui-se que a presença destes compostos por um tempo prolongado tende a despolarizar radicalmente a membrana mitocondrial. Depois de 30 min de leitura, ou seja, na marca de 34 minutos de reação, foi adicionado FCCP a 2 μM com o intuito de colapsar integralmente o $\Delta\Psi_m$. Conforme prenunciado, a incorporação do desacoplador de membrana, fez com que o potencial transmembrana dos sistemas fosse reduzido.

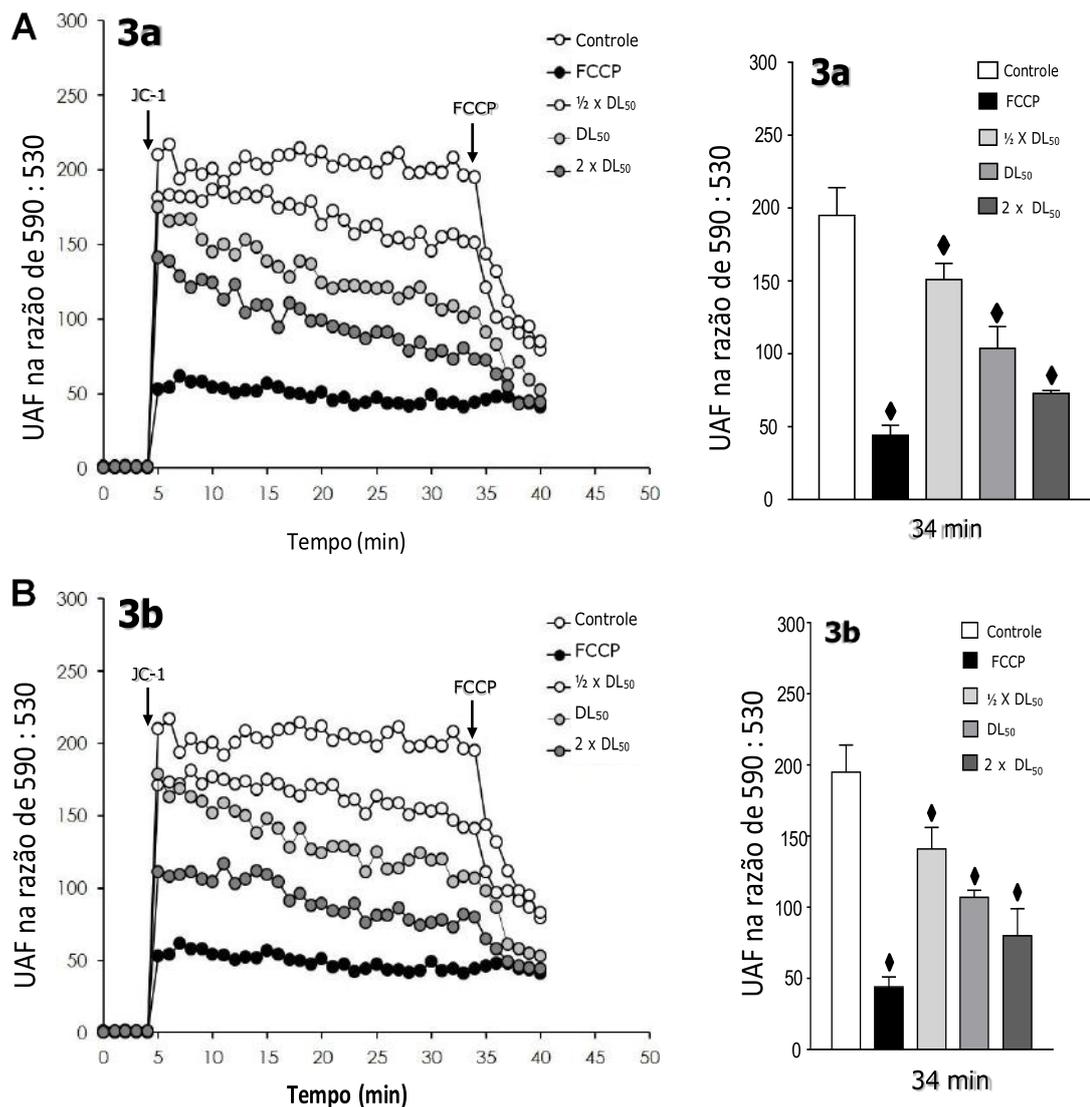


Figura 11. Análise de despolarização da membrana mitocondrial dos parasitos. Células tripomastigotas do parasito (10^6) foram incubadas em uma placa de 96 poços durante 24 horas, na ausência (**bolas e barra brancas**) ou na presença de doses únicas dos compostos 3a (**A**) e 3b (**B**), em três concentrações diferentes. A leitura foi realizada através da espectrofotometria (590:530 nm) utilizando o JC- 1, aplicado com 5 min de leitura. Como controle positivo de despolarização membranar, foi utilizado o desacoplador FCCP (**bolas e barras pretas**). A Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF) expressa a intensidade da fluorescência. Os símbolos indicam as diferenças significativas em relação ao controle ($P < 0,05$).

5.3. Efeito citotóxicos dos compostos derivados de aminopiridinas sob células epiteliais

Baseando-se em resultados prévios que mostravam uma redução na viabilidade de tripomastigotas após o tratamento, por 24h, com os compostos derivados de aminopiridinas, torna-se necessário a verificar a ação dos compostos sobre as células animais. As células epiteliais LLC- MK₂ foram tratadas por 24 (**Fig. 12A**) ou 72h (**Fig. 12B**) com ambos os compostos. No tratamento por 24h com os compostos 3a e 3b, é possível observar que apenas

as três maiores concentrações apresentaram reduções significativas, estabelecendo que a menor concentração capaz de inibir 50% da população celular é, respectivamente, 307.1 μM e 269.7 μM (Fig. 12A). Portanto pode-se afirmar que ambos os compostos, durante um tratamento de 24 horas, somente causam maiores danos as células hospedeiras quando em concentrações muito altas. Já no tratamento por 72 horas, o composto 3a apresenta reduções relevantes a partir de 25 μM , enquanto que o composto 3b indica tal redução a partir de 100 μM . Conseqüentemente gerando CC_{50} menores do que aqueles vistos no tratamento de 24h. Assim a concentração mínima responsável por reduzir metade da população celular é 125.7 μM e 175.2 μM , respectivamente (Fig. 12B).

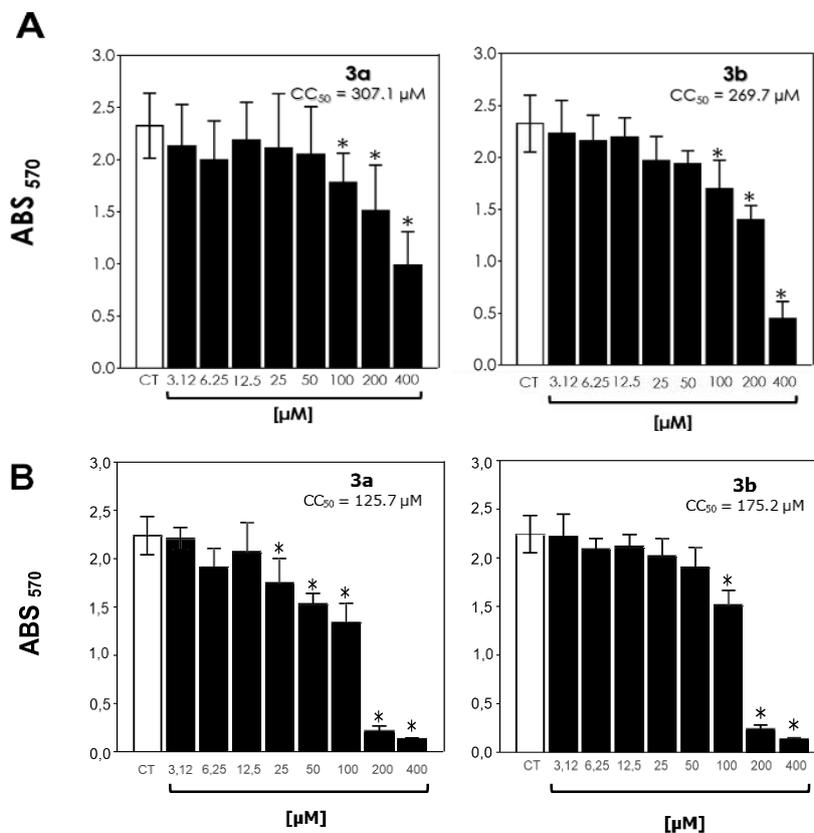


Figura 12. Citotoxicidade de derivados de aminopiridinas 3a e 3b em células LLC-MK₂. Inicialmente, células de mamíferos (10^5 células LLC-MK₂) foram incubadas em uma placa de 96 poços por 24 (A) e 72 (B) horas, na ausência (barras brancas) ou na presença de doses únicas dos compostos em diferentes concentrações (como indicado) (barras pretas). Após isto, a viabilidade foi estabelecida por espectrofotometria a 570 nm (ABS, absorvância) pelo ensaio de MTT. Os valores de CC_{50} são contabilizados para cada composto. Dados exibidos são a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes executados em triplicata.

5.4. Efeito dos compostos derivados de aminopiridinas sobre a interação de tripomastigotas com células epiteliais

Sabendo que os compostos afetam a viabilidade parasitária, no entanto provocando pouca toxicidade para as células hospedeiras, decidiu-se investigar o efeito destes compostos sobre a interação da célula LLC-MK₂ com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, afim de verificar possíveis alterações no ciclo intracelular do parasito, isto é, sobre as formas amastigotas. Para isto, 3h após a interação célula-parasito, esses sistemas foram tratados com ambos os compostos por 72h, com concentrações que mantiveram pelo menos 90% de viabilidade das células hospedeiras. O composto 3a apresentou redução significativa na porcentagem de células infectadas nas três maiores concentrações, tendo reduções de aproximadamente 36,65% em 6.25 μM , 53,95% na concentração de 12.5 μM e 68,91% quando administrado 25 μM (**Fig. 13A**). Este composto no entanto, não apresentou alterações significativas no número de amastigotas (intracelulares) por célula infectada (**Fig. 13B**) por consequência disto a redução do índice de associação (IA) do composto só se mostrou significativa na maior concentração, uma vez que a redução das células infectadas foi maior que 60% (**Fig. 13C**). Em contrapartida, o composto 3b também apresentou redução significativa na porcentagem de células infectadas nas suas três maiores concentrações, tendo reduções indo de 38,84% (12,5 μM) até 71,33% (50 μM) (**Fig. 13D**). Contudo diferentemente do composto anterior, este apresentou uma redução singela, porém significativa no número de amastigotas por célula infectada, quando na maior concentração (50 μM) (**Fig. 13E**). Por fim, o IA do composto 3b apresentou redução significante nas duas maiores concentrações, devido aos altos valores de redução da porcentagem de células infectadas e pela modesta redução do número de amastigotas por célula infectada (**Fig. 13F**). Baseando-se nos resultados do índice de associação dos compostos, foi possível calcular o IC₅₀ das células amastigotas — através de análises de regressão linear simples — onde para o 3a o resultado foi 14.6 μM ($R^2= 0,9043$) e para o 3b foi 22.4 μM ($R^2= 0,9989$).

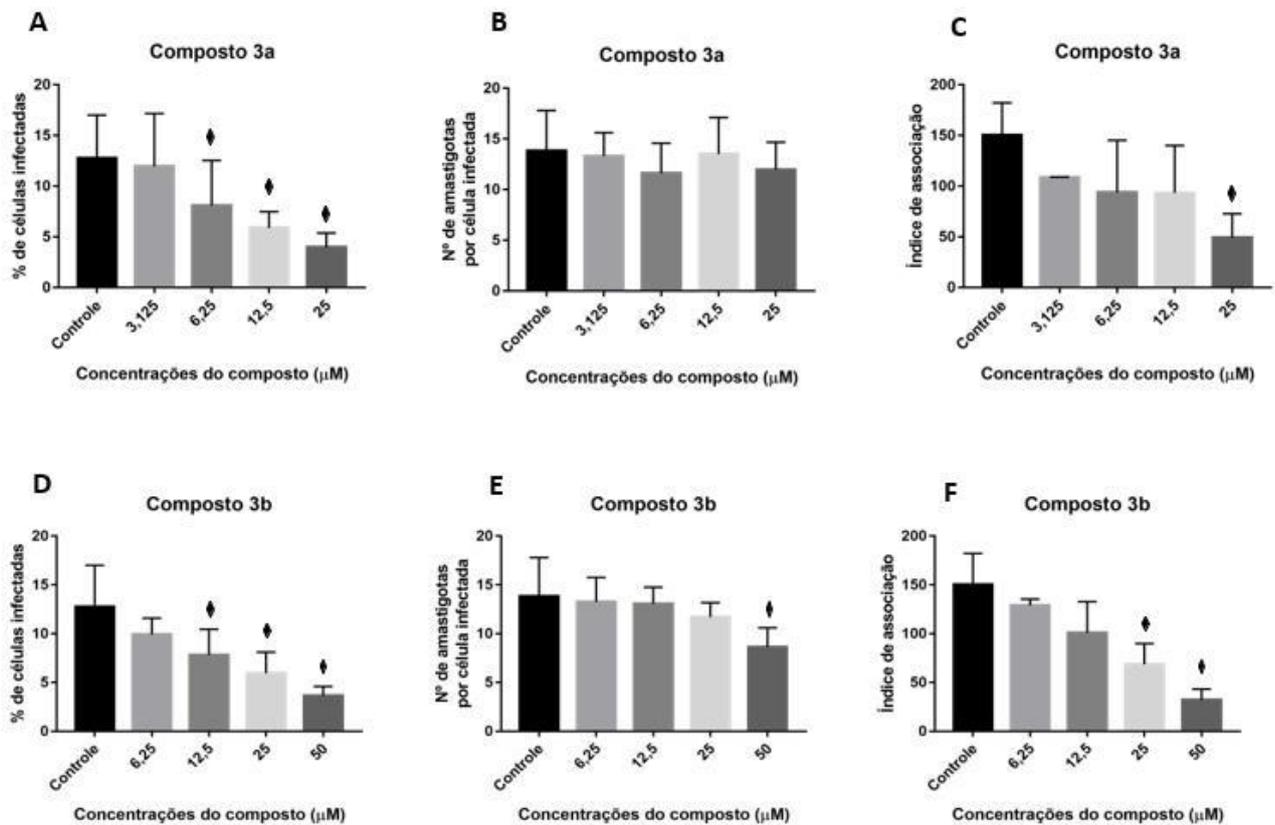


Figura 13. Efeitos do pós-tratamento com os compostos 3a e 3b sob a interação entre amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* e células LLC-MK₂. Células mamíferas (107 células LLC-MK₂) foram incubadas com as formas tripomastigotas do parasito em placas de 24 poços com lamínulas estéreis de vidro, na ausência (**barras pretas**) ou na presença de doses únicas dos compostos L112 CuCl₂(ClO₄)₂ (**A, B e C**) e AGL112 CuCl₂ (**D, E e F**) em concentrações variadas. Após 72h de tratamento, a revelação dos resultados foi feita através da coloração das lamínulas por Giemsa, o que permitiu a contagem de 200 células (infectadas e não-infectadas) e dos amastigotas intracelulares, em campos aleatórios utilizando o microscópio óptico. Dados exibidos são a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes executados em triplicate.

5.5. Índice de seletividade

Estudos preexistentes determinaram a DL₅₀ dos compostos sob as formas tripomastigotas, como 1,7 (3a) e 1,8 μM (3b) (**Tabela 1**). Posteriormente neste trabalho, foram testados os efeitos dos compostos 3a e 3b, em um tratamento de 24h, sobre a viabilidade de células epiteliais LLC-MK₂ — através do experimento de MTT — onde o CC₅₀ dos compostos 3a e 3b foram, respectivamente, 307.1 e 269.7 μM (**Tabela 1**). Os dois compostos ostentaram toxicidades extremamente baixas, tal qual constatado pelos índices de seletividade (IS) muito maiores que 10, evidenciados na **tabela 1**.

Para determinar o IS dos amastigotas intracelulares, necessitava-se saber a viabilidade celular hospedeira e parasitária, após tratamento por 72 horas com os compostos 3a e 3b. Utilizando a metodologia de MTT, estabeleceu-se o CC₅₀ dos compostos para as células LLC-

MK₂, sendo estes 125,7 μM e 175,2 μM , respectivamente (**Tabela 2**). Para as formas amastigotas intracelulares, o IC₅₀ do composto 3a foi 14,6 μM enquanto que o do 3b foi de 22,4 μM (**Tabela 2**). Estes foram definidos através de análises de regressão linear simples, baseando-se nos resultados da interação célula-parasito. Enfim, determinou-se o IS dos compostos posterior ao tratamento de 72h, no qual para 3a foi de 8,6 e para 3b 7,82.

Tabela 1. CC₅₀ e DL₅₀ para células mamíferas e tripomastigotas de *T. cruzi* e seus índices de seletividade (SI) após 24h de tratamento com os compostos

Compostos	LLC-MK ₂ [CC ₅₀]	<i>T. cruzi</i> [DL ₅₀]	LLC-MK ₂ / <i>T. cruzi</i> SI
3a	307,1 μM	1,7 μM	180,6
3b	269,7 μM	1,8 μM	149,8

Tabela 2. CC₅₀ e IC₅₀ para células mamíferas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e seus índices de seletividade (SI) após 72h de tratamento com os compostos.

Compostos	LLC-MK ₂ [CC ₅₀]	<i>T. cruzi</i> [IC ₅₀]	LLC-MK ₂ / <i>T. cruzi</i> SI
3a	125,7 μM	14,6 μM	8,6
3b	175,2 μM	22,4 μM	7,82

6. DISCUSSÃO

Mesmo com mais de um século desde sua descoberta, a doença de Chagas apresenta-se simultaneamente como uma enfermidade antiga e um problema atual. Seu agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, um parasito eucariótico que possui um ciclo de vida heteroxênico com três formas distintas, sendo elas: a epimastigota, encontrada no trato digestivo dos insetos vetores; a tripomastigota, responsável por infectar células de mamíferos; e amastigota incumbida de se replicar dentro destas células (Echeverria e Morillo, 2019).

Nos últimos anos medicamentos complexados à íons metálicos (ou metalodrogas) vêm se destacando na medicina, em especial aqueles associados à quelantes (moléculas orgânicas de alta afinidade) (Kontoghiorghes, 2020). Isso porque estas metalodrogas possuem diversos efeitos, desde antitumorais até antimicrobianos. Dentre os íons metálicos, ferro (Fe), zinco (Zn) e cobre (Cu) são os comumente utilizados no combate a bactérias, fungos e parasitos (Carver, 2019). Um estudo que avaliou os efeitos anti-*Trypanosoma cruzi* de fluoroquinolonas (3ª geração) sob tripomastigotas (cepa Y), constatou que a associação destas com íons metálicos de cobre, tornavam os compostos mais ativos. Visto que os IC₅₀ dos ligantes levofloxacina (211 µM) e esparfloxacino (114 µM) caíram em até 1,6 µM e 4,7 µM — respectivamente — quando associados à cobre (Martins *et al.*, 2012).

Com base nestas descobertas presentes na literatura, o grupo do laboratório testou compostos associados à diferentes íons metálicos, sobre promastigotas de *L. amazonensis* e tripomastigotas de *T. cruzi*. Este estudo mostrou que as metalodrogas com cobre eram duas vezes mais eficazes sobre o *T. cruzi* do que o próprio BZN e possuíam baixa toxicidade para células hospedeiras, *in vitro* (macrófagos RAW) e *in vivo* com modelo de *Galleria mellonella* (Reddy *et al.*, 2017). Em virtude destes resultados, as drogas complexadas à íons metálicos de cobre (3a e 3b) foram usados aqui para avaliar os efeitos sobre a mitocôndria parasitária de tripomastigotas do *T. cruzi*, sobre as células hospedeiras e sobre a interação parasito-célula hospedeira.

Atualmente a maioria dos compostos antiparasitários possuem como alvo a mitocôndria dos parasitos, uma vez que esta organela é fundamental para o metabolismo, bioenergética e biossíntese celular; além disto esta organela em parasitos é levemente diferente daquela vista nas células hospedeiras, permitindo que estes compostos tenham como objetivo: a cadeia transportadora de elétrons, o potencial de membrana mitocondrial, enzimas associadas à cadeia respiratória e à atividades metabólicas mitocondriais (Monzote e Gille, 2010). Sabe-se que os compostos 3a e 3b (em baixas concentrações) conseguiram reduzir a viabilidade celular parasitária, portanto foi questionado se estes compostos também teriam a mitocôndria como

alvo. Resultados do ensaio de MTT mostraram que a presença dos compostos gerou uma redução dose-dependente na concentração de enzimas fundamentais para o funcionamento mitocondrial (desidrogenases mitocondriais). Algo similar foi visto em um estudo feito pelo grupo do laboratório, onde utilizaram derivados de aminopiridina complexados à Zn^{2+} contra promastigotas de *L. amazonensis*, no qual houve uma redução em torno de 50% das desidrogenases mitocondriais parasitárias; tal redução pode ser associada à alterações ultraestruturais, que poderiam sugerir morte celular programada (MCP) (Sangenito *et al*, 2021).

Outro indicativo de MCP é a despolarização da membrana mitocondrial. A manutenção do potencial de membrana mitocondrial é primordial para a sobrevivência das células, e fatores externos (como escassez de nutrientes ou fármacos) ativam uma cascata de eventos pro-apoptóticos que desencadeiam uma série de alterações intracelulares; estas que tem início na redução do potencial de membrana mitocondrial, e desenrolam-se até mudanças na permeabilidade da membrana plasmática (Monzote e Gillie, 2010). Visto que os compostos afetavam a morfologia celular, a viabilidade das células (Reddy *et al*, 2017), e as desidrogenases mitocondriais parasitárias. Foi questionado se estes estariam relacionados com algum indicador de MCP. Para sanar esta dúvida mediu-se o potencial de membrana mitocondrial parasitária, na presença e ausência dos compostos estudados (3a e 3b). Em suma, observou-se que ambos compostos geram uma despolarização drástica da membrana mitocondrial parasitária, indicando que a redução na viabilidade parasitária esta relacionada com a paralisação mitocondrial. Resultados similares foram vistos em um estudo que avaliou os efeitos tripanocidas de compostos baseados em fenantrolina. Neste observaram — através de microscopia eletrônica de transmissão — alterações morfológicas típicas de apoptose, na qual relacionaram com a despolarização da membrana mitocondrial. (Menna-Barreto, 2019; Zuma *et al*, 2021) No entanto não se sabe os efeitos dos compostos utilizados no presente estudo sobre a ultraestrutura celular parasitária, portanto sendo necessário mais investigações acerca deste tema.

Conforme mencionado anteriormente, em estudos prévios, os dois compostos (3a e 3b) ostentaram além da atividade tripanocida, uma baixa toxicidade para as células hospedeiras, tanto *in vitro* (modelo macrófago RAW) quanto *in vivo* (modelo *Galleria mellonella*) (Reddy *et al*, 2017). Na investigação de novos fármacos, sempre é fundamental observar seus efeitos sobre múltiplos e diversos modelos celulares. Em vista disso, o modelo selecionado neste estudo foram as células LLC-MK₂. O ensaio de citotoxicidade foi realizado por 24 e 72 horas, e como previsto os resultados foram excelentes. O CC₅₀ dos compostos (3a e 3b) para as células

LLC-MK₂, são praticamente o triplo e o dobro — respectivamente — daqueles vistos anteriormente em macrófagos RAW. Ter estes valores tão altos é formidável, pois significa que seriam necessárias concentrações altíssimas para causar danos significantes às células hospedeiras. Porém a baixa toxicidade não depende apenas do íon metálico. Um estudo recente avaliou os efeitos anti-tripanicidas de ligantes baseados em curcuminóides, associados à zinco e cobre. Utilizando o mesmo modelo celular (LLC-MK₂), viram que o valor de CC₅₀ destes compostos — ligados ao cobre — eram extremamente próximos ao do IC₅₀ de amastigotas intracelulares. Indicando que os compostos eram tão tóxicos para o parasito quanto para as células (Silva *et al*, 2020). Isto revela que estes compostos, mesmo associados à íons metálicos, eram expressamente mais tóxicos do que os vistos no presente estudo.

A partir dos resultados do ensaio de citotoxicidade por 72 horas, foram selecionadas as quatro maiores concentrações — de cada composto — que mantiveram pelo menos 90% das células animais viáveis, afim de observar seus efeitos sobre a infecção da célula hospedeira. A redução no percentual de células infectadas insinua que estes compostos teriam matado a população de parasitos intracelulares. Todavia na maioria das concentrações, as células infectadas mantiveram o número de amastigotas intracelulares, desta forma apenas houve redução do IA nas maiores concentrações administradas. Através de regressão linear simples, foi possível determinar o IC₅₀ dos compostos — 14,6 µM para o 3a e 22,4 µM para o 3b —, ou seja, a concentração capaz de inibir metade da população de amastigotas intracelulares. Em um estudo compararam os efeitos anti-parasitários de compostos associados a cobre com o benznidazol. Para isto determinaram e compararam o IC₅₀ do BZN (15,83 µM) com os outros compostos, cuja maioria dos IC₅₀ eram de valores inferiores à este (Boutaleb-Charki *et al*, 2009). Considerando estes parâmetros, é possível ver que o IC₅₀ do composto 3a esta abaixo deste valor, enquanto que o do 3b esta ligeiramente acima. Significando que o composto 3a é mais eficaz na eliminação de amastigotas intracelulares do que o BZN.

Com os resultados obtidos no estudo prévio e na atual pesquisa, foi possível determinar o índice de seletividade (IS) dos compostos. O índice de seletividade é uma razão entre a concentração tóxica para o modelo celular escolhido (CC₅₀) e a concentração efetiva para o parasito (DL₅₀/IC₅₀) de um composto. Este índice é fundamental para indicar o potencial de uma droga, portanto existe um valor base pra se guiar (Indrayanto, Putra e Suhud, 2020). Para os compostos 3a e 3b, os índices de seletividade com 24 horas de tratamento são excelentes. Quando o tratamento é prolongado (72h) observa-se uma queda no IS. Para explicar este fenômeno, deve-se levar em consideração alguns fatores, como: o contato indireto dos

amastigotas intracelulares com os compostos, fazendo com que estes precisem ultrapassar a membrana plasmática da célula hospedeira e viajar até os fagolisossomos (Van Assche *et al*, 2011). Como vistos em modelos de interação entre *Leishmania amazonensis* e macrófagos RAW, a célula hospedeira pode degradar os compostos, diminuindo ainda mais sua concentração intracelular (Sangenito *et al*, 2021). Além disso as formas amastigotas e tripomastigotas possuem diferenças nos perfis de susceptibilidade, que estão relacionadas com alvos celulares e mecanismos de captação/ extrusão distintos entre as formas (Timm *et al*, 2014). Todavia ainda que abaixo de 10 os compostos 3a e 3b são, respectivamente, oito e sete vezes mais tóxicos para os parasitos do que para as células hospedeiras.

7. CONCLUSÕES

Ao todo os resultados no presente trabalho mostram que os compostos derivados de aminopiridinas associados a complexos metálicos, são extremamente efetivos *in vitro* contra as formas tripomastigota e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*. Uma vez que com concentrações baixas, é possível observar alterações nas desidrogenases mitocondriais e a despolarização da membrana mitocondrial parasitária, desta forma levando a crer que a mitocôndria é uma organela alvo destes compostos. Além de seus efeitos sobre o parasito, os compostos também possuem baixa toxicidade para as células hospedeiras. Como consequência destes fatores e do tratamento da interação parasito-célula hospedeira, determinou-se o índice de seletividade dos compostos, que por sua vez se apresentaram como extremamente satisfatórios. Desta forma podemos considerar que os derivados de aminopiridinas complexados à íons metálicos, são candidatos muito interessantes na busca por um novo tratamento da doença de Chagas e — possivelmente — outras parasitoses.

8. REFERÊNCIAS

- Amato Neto, V., Campos, R., & Higaki, Y. (1974). Análise clínica e baseada em exames subsidiários de pacientes da qual foi isolada, há vinte e três anos, a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* Vol. 16, pp. 238–244.
- America, L. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section d'hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 90, 33–43.
- Azambuja, P. e Garcia, E. S. (2017) Ciclo evolutivo: Hospedeiro Invertebrado. Portal da Doença de Chagas , Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, 30 jun. 2017. Disponível em < <http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em: 06 ago. 2020.
- Arreola-Mora, C., Silva-Pereyra, J., Fernández, T., Paredes-Cruz, M. e Bertado-Cortés, B. (2019). Effects of 4-aminopyridine on attention and executive functions of patients with multiple sclerosis: Randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Preliminary report. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 28, 117-124.
- Azevedo-França, J. A., Borba-Santos, L. P., de Almeida Pimentel, G., Franco, C. H. J., Souza, C., de Almeida Celestino, J., de Menezes, E. F., dos Santos, N. P., Vieira, E. G., Ferreira, A. M. D. C., de Souza, W., Rozental, S., & Navarro, M. (2021). Antifungal promising agents of zinc(II) and copper(II) derivatives based on azole drug. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 219(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111401>
- Boutaleb-Charki, S., Marin, C., Maldonado, C., Rosales, M., Urbano, J., Guitierrez-Sanchez, R., Quiros, M., Salas, J., & Sanchez-Moreno, M. (2009). Copper (II) Complexes of [1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pyrimidine Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents. *Drug Metabolism Letters*, 3, 35–44. <https://doi.org/10.2174/187231209787176317>
- Brown, R. W., & Hyland, C. J. T. (2015). Medicinal organometallic chemistry - an emerging strategy for the treatment of neglected tropical diseases. *MedChemComm*, 6, 1230–1243. <https://doi.org/10.1039/c5md00174a>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* Vol. 1, pp. 159–218. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008>
- Chohan, Z. H., Arif, M., Akhtar, M. A., & Supuran, C. T. (2006). Metal-based antibacterial and antifungal agents: Synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes with amino acid-derived compounds. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2006, 1–13. <https://doi.org/10.1155/BCA/2006/83131>
- Campos, M. C. O., Leon, L. L., Taylor, M. C. e Kelly, J. M. (2014) Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular & Biochemical Parasitology* 193, 17-19.
- Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: Toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*, 20, 22–35. <https://doi.org/10.1177/1087057114550585>
- Corassa, R. B., Aceijas, C., Alves, P. A. B., & Garelick, H. (2017). Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review. *Perspectives in Public Health*, 137, 289–295. <https://doi.org/10.1177/1757913916671160>
- Colotti, G., Fiorillo, A., & Ilari, A. (2018). Metal- and metalloid-containing drugs for the treatment of trypanosomatid diseases. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 23, 954–966. <https://doi.org/10.2741/4628>
- Carver, P. L. (2019). Metals in Medicine: The Therapeutic Use of Metal Ions in the Clinic. *Metal Ions in Life Sciences*, 19, 1–16. <https://doi.org/10.1515/9783110527872-007>

CDC (2019) Parasites- American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Biology. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em 06/08/2020.

Barceloux, D. G. e Barceloux, D. (1999). Copper. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37, 217-230, DOI: 10.1081/CLT-100102421.

Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 33, 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>

Fidalgo, L. M., & Gille, L. (2011). Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. *Pharmaceutical Research*, 28, 2758–2770. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0586-3>

Frantz, M. C., & Wipf, P. (2010). Mitochondria as a target in treatment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 462–475. <https://doi.org/10.1002/em.20554>

Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Olmo, F., Lewis, M. D., Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2020). Challenges in Chagas Disease Drug Development. *Molecules*, 25, 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules25122799>

Goldstein, J. C., Muñoz-Pinedo, C., Ricci, J. E., Adams, S. R., Kelekar, A., Schuler, M., Tsien, R. Y., & Green, D. R. (2005). Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 453–462. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401596>

Gandra, R. M., Carron, P. M., Fernandes, M. F., Ramos, L. S., Mello, T. P., Aor, A. C., Branquinha, M. H., McCann, M., Devereux, M., & Santos, A. L. S. (2017). Antifungal potential of copper(II), Manganese(II) and silver(I) 1,10-phenanthroline chelates against multidrug-resistant fungal species forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the planktonic and biofilm lifestyles. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01257>

Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* Vol. 46. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>

Junqueira, P. C., Rosenblit, J., & Hamerschlag, N. (2005). História da Hemoterapia no Brasil History of Brazilian Hemotherapy. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapiamatologia e Hemoterapia*, 27, 201–207.

Jurberg, J., Rodrigues, J. M. S., Moreira, F. F. F., Dale, C., Cordeiro, I. R. S., Lamas Jr, V. D., Galvão, C., & Rocha, D. da S. (2014). *Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas)*. 58.

Kropf, S. P. (2017) Descoberta: Carlos Chagas e a descoberta de uma nova tripanossomíase humana. Portal da Doença de Chagas, Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, 27 jun. 2017. Disponível em <<http://chagas.fiocruz.br/a-descoberta/#descoberta>>. Acesso em: 06 ago. 2020.

Kalla, R. e Strupp, M. (2019). Aminopyridines and Acetyl-DL-leucine: New Therapies in Cerebellar Disorders. *Current Neuropharmacology* 17, 7-13.

Kontoghiorghes, G. J. (2020). Advances on chelation and chelator metal complexes in medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–8. <https://doi.org/10.3390/ijms21072499>

Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>

Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J. e Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* 7, 1-13.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55–63.
- Macedo-Silva, S. T. de, Oliveira Silva, T. L. A. de Urbina, J. A., Souza, W. de, & Rodrigues, J. C. F. (2011). Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Molecular Biology International*, 2011, 1–12. <https://doi.org/10.4061/2011/876021>
- Martins, D. A., Gouvea, L. R., Da Gama Jean Batista, D., Da Silva, P. B., Louro, S. R. W., De Nazaré C. Soeiro, M., & Teixeira, L. R. (2012). Copper(II)-fluoroquinolone complexes with anti- *Trypanosoma cruzi* activity and DNA binding ability. *BioMetals*, 25, 951–960. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9565-3>
- Martins, D. A., Gouvea, L. R., Muniz, G. S. V., Louro, S. R. W., Batista, D. D. G. J., Soeiro, M. D. N. C., & Teixeira, L. R. (2016). Norfloxacin and N-Donor Mixed-Ligand Copper(II) Complexes: Synthesis, Albumin Interaction, and Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5027404>
- Menna-Barreto, R. F. S. (2019). Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death and Disease*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>
- Mills, R. M. (2020). Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *American Journal of Medicine*, 133, 1262–1265. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>
- Ministério da Saúde (2020). Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>. Acesso em 17/05/2021.
- Mosquillo, M. F., Bilbao, L., Hernández, F., Machado, I., Gambino, D., Garat, B. e Pérez-Díaz, L. (2018). Effect of a new anti-*T.cruzi* metallic compound based on palladium. *Biometals* 31, 961–974.qq
- Monzote, L. e Gille, L. (2010). Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. *Current Clinical Farmacology* 5, 55-66.
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., & Sosa-Estani, S. (2018). Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11, 943–957. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>
- Neves, D. P. (2016). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas . In: *Parasitologia Humana*. 13. Ed. (São Paulo: Editora Atheneu), pp. 91-117.
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 1727, 4-Aminopyridine. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Aminopyridine>. Acesso em: 06/08/2020.
- Oliveira-Silva, J. C. V., Machado-de-Assis, G. F., Oliveira, M. T., Paiva, N. C. N., Araújo, M. S. S., Carneiro, C. M., Martins-Filho, O. A., Martins, H. R. e Lana, M. (2015) Experimental benznidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* II strains isolated from children of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, with Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 86-94.
- Pinheiro, E., Brum-Soares, L., Reis, R., & Cubides, J. C. (2017). Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50, 296–300. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0433-2016>
- Portes, J. A., Motta, C. S., Azeredo, N. F., Fernandes, C., Horn, A., De Souza, W., DaMatta, R. A., & Seabra, S. H. (2017). In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. *Veterinary Parasitology*, 245, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.002>

PAHO (2017). Chagas disease. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> . Acesso em: 05/08/2020.

Paixão, D. A., Lopes, C. D., Carneiro, Z. A., Sousa, L. M., Oliveira, L. P., Lopes, N. P., Pivatto, M., Chaves, J.D.S., Almeida, M. V., Ellena, J., Moreira, M. B., Netto, A. V. G., Oliveira, R. J., Guilardi, S., Albuquerque, S. e Guerra, W. (2019). In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of ternary copper(II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109, 157-166.

Reddy, A., Sangenito, L. S., Guedes, A. D. A., Branquinha, M. H., Kavanagh, K., McGinley, J., Dos Santos, A. L. S., & Velasco-Torrijos, T. (2017). Glycosylated metal chelators as anti-parasitic agents with tunable selectivity. *Dalton Transactions*, 46, 5297–5307. <https://doi.org/10.1039/c6dt04615k>

Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari, N. D. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176, 139–148. <https://doi.org/10.1111/cmi.12807>. Targeting

Soni, N. e Kam, P. (1982). 4-Aminopyridine – A Review. *Anaesth Intens Care* 10, 120-126.

Sangenito, L. S., Ennes-Vidal, V., Marinho, F. A., Mota, F. F., Santos, A. L. S., d’Avila-Levy, C. M. e Branquinha, M. H. (2009). Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology* 136, 433-441

Sangenito, L. S (2015). Influência de inibidores de aspártico peptidases sobre a fisiologia de *Trypanosoma cruzi*. Tese (Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 133f.

Sangenito, L. S., d’Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2016). Nelfinavir and lopinavir impair *Trypanosoma cruzi* trypomastigote infection in mammalian host cells and show anti-amastigote activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.017>

Sangenito, L. S., Menna-Barreto, R. F. S., Oliveira, A. C., d’Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2018). Primary evidence of the mechanisms of action of HIV aspartyl peptidase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.021>

Sangenito, L. S., da Silva Santos, V., d’Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H., Souza dos Santos, A. L., & de Oliveira, S. S. C. (2019). Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19, 174–177. <https://doi.org/10.2174/156802661903190328155136>

Sangenito, L. S. (2015). Influência de inibidores de aspártico peptidases sobre a fisiologia de *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 116f.

Sangenito, L. S., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2020). Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020088>

Sangenito, L. S., Rodrigues, H. D., Santiago, S.O., Bombaça, A. C. S., Menna-Barreto, R. F. S., Reddy, A., Branquinha, M. H., Velasco-Torrijos, T., Santos, A.L S. (2021). In vitro effects of bis(N-[4-(hydroxyphenyl)methyl]-2-pyridinemethamine) zinc perchlorate monohydrate 4 on the physiology and interaction process of *Leishmania amazonensis*. *Parasitology International*, 84, 102376.

Santos, L. O., Marinho, F. A., Altoé, E. F., Vitória, B. S., Alves, C. R., Britto, C., Motta, M. C. M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S. e d’Avila-Levy, C. M. (2009). HIV Aspartyl Peptidase Inhibitors Interfere with Cellular Proliferation, Ultrastructure and Macrophage Infection of *Leishmania amazonensis*. *Plos One* 4, e4918.

Santos, A. L. S., Sodre, C., S. Valle, R., A. Silva, B., A. Abi-chacra, E., V. Silva, L., L. Souza-Goncalves, A., S. Sangenito, L., S. Goncalves, D., O.P. Souza, L., F. Palmeira, V., M. d’Avila-Levy, C., F. Kneipp, L., Kellett, A., McCann, M., & H. Branquinha, M. (2012). Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the

Microorganism Development, Virulence and Pathogenesis. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 2715–2737. <https://doi.org/10.2174/092986712800609788>

Santos, L., Garcia-Gomes, A., Catanho, M., Sodre, C., Santos, A., Branquinha, M., & d'Avila-Levy, C. (2013). Aspartic Peptidases of Human Pathogenic Trypanosomatids: Perspectives and Trends for Chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 3116–3133. <https://doi.org/10.2174/0929867311320250007>

Souza, W. (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research*, 88, 1013–1025. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0696-2>

Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 89–100. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900014>

Souza, W., & Barrias, E. S. (2020). May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? *Acta Tropica*, 212, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105688>

Sieveking, I., Thomas, P., Estévez, J. C., Quiñones, N., Cuéllar, M. A., Villena, J., Espinosa-Bustos, C., Fierro, A., Tapia, R. A., Maya, J. D., López-Muñoz, R., Cassels, B. K., Estévez, R. J., & Salas, C. O. (2014). 2-Phenylaminonaphthoquinones and related compounds: Synthesis, trypanocidal and cytotoxic activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(17), 4609–4620. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.030>

Silva, B. A., Pitasse-Santos, P., Sueth-Santiago, V., Monteiro, A. R. M., Marra, R. K. F., Guedes, G. P., Ribeiro, R. R., de Lima, M. E. F., Decoté-Ricardo, D., & Neves, A. P. (2020). Effects of Cu(II) and Zn(II) coordination on the trypanocidal activities of curcuminoid-based ligands. *Inorganica Chimica Acta*, 501(October 2019), 119237. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119237>

SVS (2021). Ministério da Saúde. Número especial, 14 de abril de 2021. Boletim Epidemiológico Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>. Acesso em 17/05/2021.

Telleria, J., & Tibayrenc, M. (2017). American Trypanosomiasis, 100 Years of Research Chagas Disease. <https://doi.org/9780128010693>

Tezuka, D. Y. (2015). Triagem de compostos anti-chagásicos com o *Trypanosoma cruzi* e leishmanicidas com as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 96f.

Turner, R. J. (2017). Metal-based antimicrobial strategies. *Microbial Biotechnology*, 10, 1062–1065. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12785>

Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A., Maes, L., & Cos, P. (2011). Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free radical biology & medicine*, 51, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>

Valamiel Oliveira-Silva, J. C., Machado-De-Assis, G. F., Oliveira, M. T., Nogueira Paiva, N. C., Silva Araújo, M. S., Carneiro, C. M., Martins-Filho, O. A., Martins, H. R., & De Lana, M. (2015). Experimental benzimidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* ii strains isolated from children of the jequitinhonha valley, Minas Gerais, Brazil, with chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 86–94. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140260>

Veiga-Santos, P., Barrias, E. S., Santos, J. F. C., De Barros Moreira, T. L., De Carvalho, T. M. U., Urbina, J. A., & De Souza, W. (2012). Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.009>

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7, 157–163. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>

Votýpka, J., d'Avila-Levy, C. M., Grellier, P., Maslov, D. A., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2015). New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, 31, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015>

WHO (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 90, 33–43.

Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A. e Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*, 46, D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>

Zaidel, E. J., Forsyth, C. J., Novick, G., Marcus, R., Ribeiro, A. L. P., Pinazo, M. J., Morillo, C. A., Echeverría, L. E., Shikanai-Yasuda, M. A., Buekens, P., Perel, P., Meymandi, S. K., Ralston, K., Pinto, F., & Sosa-Estani, S. (2020). COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. *Global Heart*, 15, 1–15. <https://doi.org/10.5334/GH.891>

Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., & Nurchi, V. M. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>

Zuma, A. A., da Silva, R. B., Garden, S. J., & de Souza, W. (2021). In vitro study of the trypanocidal activity of anilinophenanthrolines against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 83, 102338. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102338>