

PARA UMA DOENÇA TÃO ANTIGA, O VISLUMBRE DE NOVOS TRATAMENTOS PROMISSORES NA DOENÇA DE CHAGAS

FOR SUCH AN ANCIENT DISEASE, THE GLIMPSE OF PROMISING NEW TREATMENTS FOR CHAGAS
DISEASE

Sabrina Sehn **Hilgert**^{ID}, Sofia Comássio de Paula **Lima**^{ID}, Sofia Ferreira **Salviano**^{ID}, Cristiane **Tefé-Silva**^{ID*}

Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

*cris_tefe@hotmail.com

RESUMO

Há mais de 100 anos desde a descoberta da Doença de Chagas (DC). No entanto, o repertório indicado para o tratamento ainda é limitado. Dessa forma, este artigo visa a apresentar uma revisão das novas estratégias farmacológicas em estudo para a DC. Esta revisão de literatura, composta por 68 artigos, de 1957 a 2021, foi realizada em várias plataformas científicas. Foram descritos efeitos positivos do benznidazol, na fase aguda e crônica, além de sua associação com itraconazol na fase aguda. Dentre os inibidores de cruzaina, o composto K777 apresentou notório efeito tripanocida, apresentando, no entanto, efeitos adversos importantes, além de seu análogo WRR-483, o qual demonstrou efeitos benéficos *in vivo* e *in vitro*. Quanto aos nitroheterocíclicos, o fexinidazol apresentou altos índices de cura em modelo animal, além de baixa toxicidade. Já o nifurtimox, em fases crônicas iniciais, foi capaz de atrasar a progressão de lesões teciduais e diminuir a carga parasitária. O composto WC-9, inibidor da esqualeno sintase, demonstrou potencial inibição na replicação do *T. cruzi*. A respeito das diamidinas aromáticas, inúmeros compostos foram capazes de frear o tripanossoma, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Concluiu-se que há descobertas favoráveis à melhoria no tratamento da DC. Todavia, o desenvolvimento de medicamentos efetivos não depende somente de sua ação eficaz, mas de inúmeras variáveis que devem ser contornadas, como a diminuição de efeitos colaterais, tempo de tratamento e adesão da atual medicação de escolha, ou mesmo o investimento na produção e distribuição da mesma à população.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Inovador. Tratamento. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

It has been more than 100 years since the discovery of Chagas Disease (CD). However, the repertoire indicated for its treatment is still limited. Thus, this article aims to present a review of the new pharmacological strategies being studied for CD. This literature review, consisting of 68 articles, from 1957 to 2021, was carried out on several scientific platforms. Positive effects from benznidazole have been described in the acute and chronic phases, in addition to its association with itraconazole in the acute phase. Among the cruzain inhibitors, the compound K777 presented trypanocidal effects, although demonstrating major adverse effects, while its analogue WRR-483 demonstrated great beneficial effects *in vivo* and *in vitro*. As for the nitroheterocyclics, fexinidazole showed high rates of cure in animal model, in addition to low toxicity. Nifurtimox, in early chronic stages, was able to delay the progression of tissue damage and reduce the parasite load. The compound WC-9, a squalene synthase inhibitor, showed potential inhibition of *T. cruzi* replication. Regarding aromatic diamidines, many compounds were able to stop the trypanosome, both *in vitro* and *in vivo* models. It was concluded that there are favorable findings to improve the treatment of CD. However, the development of effective new drugs does not only depend on their effective action, but also on numerous variables that must be circumvented, such as the reduction of side effects, treatment time and adherence to the current medication of choice, as well as the investment in production and distribution to the population.

Keywords: Chagas disease. Innovative. Treatment. *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUÇÃO

No ano de 1909, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, médico sanitaria brasileiro, entrou para história devido à descoberta da Doença de Chagas (DC) a partir de seus estudos feitos em Lassance, pequena cidade no interior de Minas Gerais (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010). Trata-se de um marco histórico no meio científico médico, uma vez que Carlos Chagas foi um dos poucos cientistas a descobrir uma patologia, descrever o agente causador da doença, *Trypanosoma cruzi*, identificar o vetor transmissor, o triatomíneo hematófago conhecido popularmente como “barbeiro”, e dissertar sobre os dados epidemiológicos, clínicos e sociais de sua nova descoberta (MAGALHÃES, 2010).

Atualmente, a DC apresenta-se como um quadro endêmico em 21 países das Américas e afeta aproximadamente 6 milhões de pessoas. Estima-se que há 70 milhões de pessoas vivendo em áreas de exposição e risco nos países americanos, sendo sua taxa de incidência de 30.000 casos por ano e com o número anual de mortes próximo a 14.000 óbitos (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2017). No Brasil, medidas tomadas a respeito do controle vetorial, triagem de candidatos para doação de sangue, órgãos e tecidos reduziram substancialmente a taxa de incidência de casos de DC no território brasileiro (BRASIL, 2019). No entanto, a partir do ano de 2005 a obrigatoriedade de notificação foi retomada devido à repercussão na saúde pública nacional devido à identificação da transmissão oral da doença (DIAS *et al.*, 2016).

A DC apresenta duas fases clínicas bem estabelecidas: aguda e crônica. A primeira é caracterizada pela presença da forma tripomastigota metacíclica do *Trypanosoma cruzi* no sangue, responsável pelo primeiro contato com a célula hospedeira, a qual depende de interação de moléculas do parasita com a célula, uma série de sinalizações em cascata e mobilização de Ca^{2+} , a fim de ocorrer o processo de invasão celular (YOSHIDA; CORTEZ, 2008). A sintomatologia aguda, quando presente, se expressa por mal-estar, febre, hepatoesplenomegalia, enfartamento de linfonodos, distúrbios cardíacos ou mesmo a presença do sinal de *Romaña*, edema palpebral unilateral causado pela contaminação da conjuntiva ocular por fezes infectadas do triatomíneo (KÖBERLE, 1968).

Após esse estágio, a doença entra em um longo período assintomático, na qual a presença do parasita no meio sanguíneo encontra-se em níveis indetectáveis. A evolução da doença culmina na fase crônica, na qual se pode observar a manifestação da forma cardiopata, forma digestiva ou da forma associada (cardiodigestiva) (DIAS; COURA, 1997). A fase crônica é resultado da proliferação do parasita nas fibras musculares do coração, esôfago ou cólon, no período assintomático, que leva a processos inflamatórios generalizados nos tecidos infectados, a resultar na disfunção severa dos órgãos acometidos (LOPES; CHAPADEIRO, 1997). O acometimento cardíaco pode ser fatal, seu desfecho é relativo ao aumento do coração e distúrbios de ritmo, culminando em insuficiência cardíaca congestiva e aumento do risco de ocorrer morte súbita (ROSSI, 1990).

Contam-se, portanto, mais de cento e dez anos desde o descobrimento da DC e, apesar de tanto tempo de estudo, desenvolvimento e investimento, os fármacos do mercado indicados para o tratamento continuam restritos a pouca variabilidade e disponibilidade que se comparada com outras zoonoses. No entanto, estudos recentes têm apontado resultados promissores na formulação de novas terapias que prometem auxiliar no tratamento. Esse artigo tem como objetivo apresentar uma revisão das mais novas estratégias farmacológicas em estudo com resultados promissores no tratamento da DC focando nos alvos desses compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se uma revisão da literatura, proporcionando informações sobre o desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos empregados no tratamento da DC e sua aplicabilidade na relação custo-benefício. A busca foi feita pelas plataformas digitais: Biblioteca Digital da USP; Scielo; Google Acadêmico; PubMed; EBSCO; CAPES e ScienceDirect. Termos usados nestas plataformas foram: “Doença de Chagas”, “novos tratamentos”, “Benznidazol”, “Diamidinas aromáticas”, “Antifúngicos Azólicos”, “Benzonidazol Itraconazol”, “Inibidor de Cruzaína”, “Nitroheterocíclicos”,

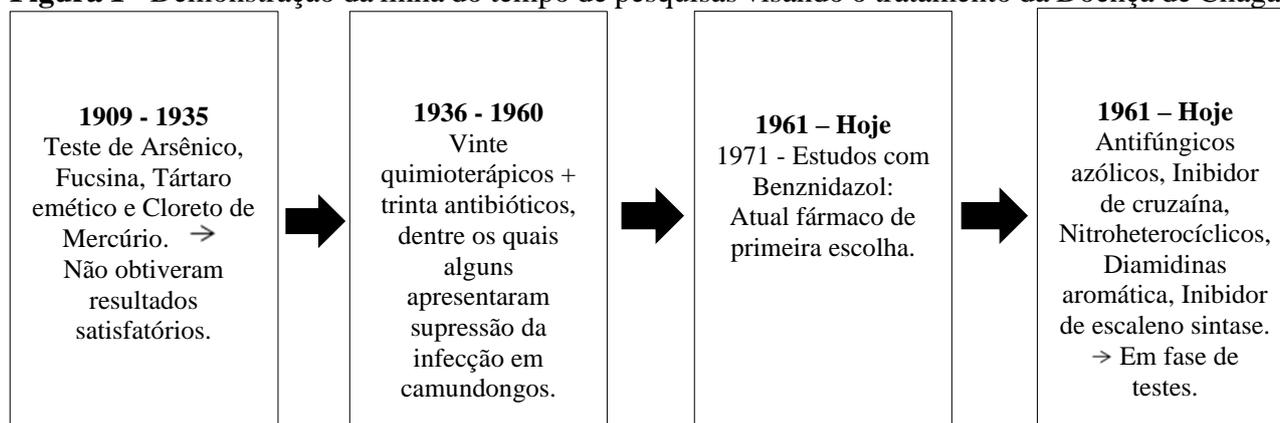
“Inibidores de Esqualeno Sintase” e seus correspondentes traduzidos para o inglês “Chagas disease”, “new treatment”, “benzonidazole”, “aromatic diamidines”, “azole abtifungals”, “benzonidazole itraconazole”, “cruzaine inhibitor”, “nitroheterocyclic”, “squalene synthase inhibitors”. Um total de 68 artigos foram selecionados, de acordo com um critério de inclusão pré-definido, os quais foram publicados entre os anos de 1957 e 2021.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Histórico do Tratamento

A evolução do tratamento da DC pode ser dividida em três longos períodos. O primeiro é entre 1909 e 1935, no qual foram publicados dois trabalhos com o teste de arsênio, fucsina, tártaro emético e cloreto de mercúrio, os quais não obtiveram resultados satisfatórios (DAVANÇO, 2015). De 1936 a 1960, houve uma maior publicação de trabalhos, na qual foram descritos resultados a cerca de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos, com desfechos mais promissores de compostos (DIAS *et al.*, 2009), como a nitrofurazona, furaltadona e furazolidona que atuavam na supressão da infecção do tripanosoma em camundongos (PACKCHANIAN, 1957). O terceiro período vai do ano de 1961 até os dias atuais, fase na qual se marca a maior quantidade de estudos e avaliação de substâncias em modelos experimentais. Neste período, os compostos lapachol, β -lapachol e seus derivados são descritos como substâncias de potencial tripanocida a partir da indução de liberação de radicais livres, proporcionando uma alteração na estrutural da cromatina, entumescimento na membrana mitocondrial, além de inibir a síntese de DNA e RNA, dentre outras alterações na síntese proteica, membrana citoplasmática e nuclear (PINTO; CASTRO, 2009). No entanto, foi demonstrado que essas substâncias poderiam ser inativadas por meio da interação com proteínas séricas ou pelo contato com oxihemoglobina (LOPES *et al.*, 1978). Por volta de 1971, surgem dois medicamentos com resultados positivos na fase aguda: benznidazol e nifurtimox (DIAS *et al.*, 2009). Atualmente, o benznidazol (BNZ) é o fármaco de primeira escolha no tratamento da DC aguda (DIAS *et al.*, 2016).

Figura 1 - Demonstração da linha do tempo de pesquisas visando o tratamento da Doença de Chagas.



Fonte: Dias *et al.* (2009), Davanço (2015) e Dias *et al.* (2016), adaptado

Benznidazol

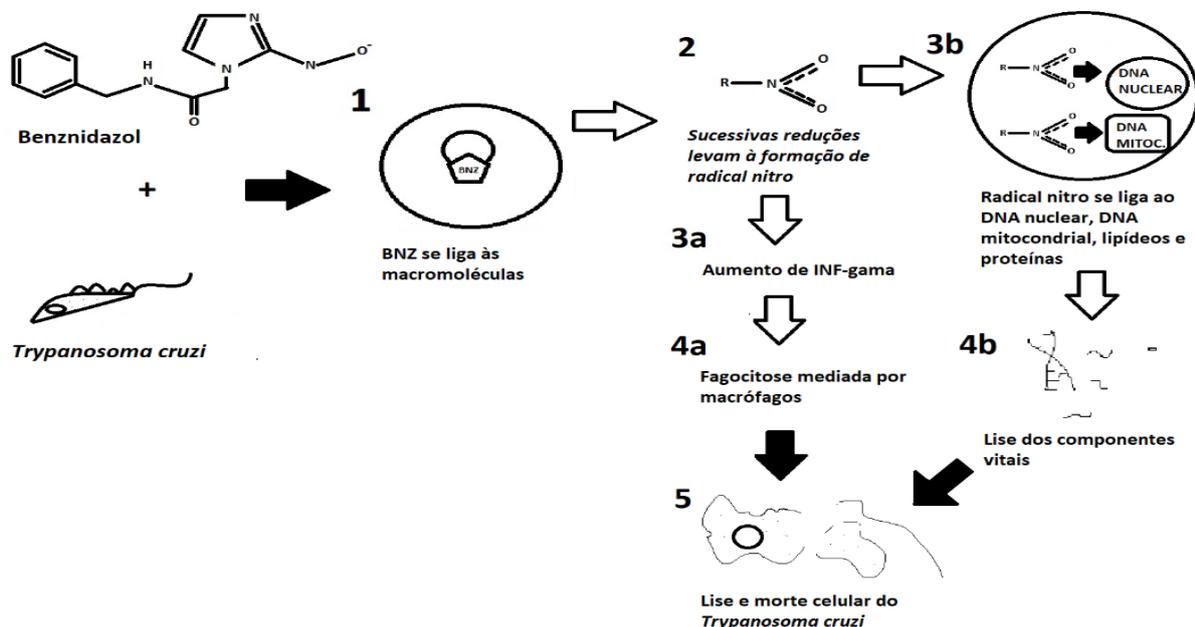
Utilizado como tratamento de primeira linha no Brasil, o benznidazol (BNZ) exerce efeito ao se ligar a macromoléculas do parasita. Isso ocorre por meio de metabolizações, descritas na Figura 1 (CASTRO; DIAZ DE TORANZO, 1988; DAVANÇO, 2015), além de sinalização celular à síntese de IFN- γ , que induz células fagocitárias a produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ativando também linfócitos T CD8+, que passam a desempenhar sua atividade citotóxica (LOURDES, 2013; ALEXANDRE; TESTON; ZANUSSO JÚNIOR, 2014). Dessa forma, reduz a

parasitemia, levando à cura na fase aguda na grande maioria dos casos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Alguns estudos atuais sugerem, ainda, que o tratamento na fase crônica é capaz de reduzir as afecções consequentes causadas pelo tripanossoma, havendo índices que apontam preservação cardíaca, menor dispneia e aumento da concentração sérica da interleucina-17 (IL-17) mediado pelo BNZ. A IL-17 é uma interleucina imunorreguladora fundamental para proteção sistêmica na fase crônica de Chagas (CAMARA *et al.*, 2018). Recentemente, Cardoso e colaboradores (2018) demonstraram que ao iniciar tratamento com BNZ em pacientes com DC crônica, idade menor que 50 anos e alterações no eletrocardiograma, reduziu-se significativamente a mortalidade, carga parasitária e grau de insuficiência cardíaca, quando comparados ao grupo controle que não havia recebido BNZ, após dois anos de acompanhamento (CARDOSO *et al.*, 2018). Entretanto o uso do BNZ está contraindicado na fase tardia da doença cardíaca crônica (em que há arritmias graves, fração de ejeção < 40% ou presença de insuficiência cardíaca) induzida pela DC, conforme publicado pelo Ministério da Saúde (CONITEC, 2018). Isso porque, na fase cardíaca crônica, não foi evidenciado que o BNZ seja capaz de desacelerar a progressão da cardiopatia, podendo, inclusive, causar piora do quadro (VIOTTI *et al.*, 2006; MORILLO *et al.*, 2015).

Atualmente, além da formulação de 100 mg para adultos, possui também formulação pediátrica. Desde 2011, são aprovados para uso infantil comprimidos de 12,5 mg, utilizados para bebês e crianças com até dois anos de idade, portadores da Doença de Chagas. A dosagem aconselhada é de 5 a 7 mg/kg diários, divididos em duas tomadas. Além da posologia favorável, podem ser facilmente desintegrados em água potável ou suco de laranja, facilitando sua administração na faixa etária indicada (DNDI, 2011; LAFEPE, 2018).

Figura 2 – Esquemática do mecanismo de ação do Benznidazol frente ao *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Castro, Dias de Toranzo (1988), Coura, Borges-Pereira (2012) e Davanço (2015), adaptado.

Entretanto os inúmeros e frequentes efeitos adversos causados pelo medicamento levam a altos índices de abandono do tratamento e aumento nas comorbidades próprias da progressão da doença. É o que foi apontado durante um estudo de coorte retrospectivo realizado em 2018 na Unicamp, em que, dos 204 pacientes incluídos, apenas 172 concluíram tratamento devido a afecções, tendo em vista que, do total, foram 85 (41,66%) pacientes que desenvolveram alterações cutâneas (erupção morbiliforme, eritema, prurido), hepáticas (elevação da fosfatase alcalina, TGO, TP e γ GT), digestivas (dor epigástrica), hematológicas (neutrofilia) e/ou neurológicas (parestesia por

radiculopatia, além de dor em extremidades) (PAVAN *et al.*, 2018). Além disso, há instrução de apenas prescrever BNZ a gestantes em casos de indicação absoluta, pois possui potencial teratogênico demonstrado em estudos *in vivo* com animais (LAFEPE, 2018).

Antifúngicos azólicos: Itraconazol e Posaconazol

Além das macromoléculas vitais em que o BNZ atua, outro alvo bioquímico capaz de incapacitar a atividade do *T. cruzi* é a via que sintetiza o ergosterol. Trata-se de um componente vital na estrutura da membrana plasmática do parasita, cuja função é semelhante à do colesterol nas membranas humanas (FIUZA, 2018). Esta classe de medicamentos – os antifúngicos azólicos – atuam inibindo a enzima CYP51, de modo a evitar que lanosterol seja convertido a zimosterol e posterior ergosterol, culminando em uma membrana plasmática afuncional (CATALÁN; MONTEJO, 2006). Além de impedir a formação desse esteroide, os fármacos dessa classe ainda garantem que os precursores tóxicos se acumulem na membrana celular, afetando sua integridade de maneira dupla (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Foram realizados, separadamente, testes *in vitro* com fluconazol, itraconazol (ITZ) e cetoconazol, fármacos cujas atividades antifúngicas são comprovadas. Entretanto, ao contrário do esperado, não alcançaram resultados significativos no combate ao protista *in vivo* na fase aguda da doença de Chagas, não diminuindo a carga parasitária sistêmica a níveis suficientes (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Isso pode ser explicado tendo em vista a lipofilicidade do ITZ: não ocorre boa absorção oral, gerando baixa biodisponibilidade. Além disso, o fármaco possui baixa potência, sendo necessárias altas doses para que surta efeito desejado *in vivo* contra o tripanossoma (FRANÇA *et al.*, 2014).

Quanto a testes em fase crônica, um estudo experimental inoculou cepas do tripanossoma em 120 camundongos e os manteve vivos sem tratamento durante 90 dias, de modo a cronificar a doença. Ao final dos três meses, apenas 60 camundongos sobreviveram e foram, então, divididos em três grupos. O primeiro grupo contou com 45 animais que receberam 100mg/kg/dia, em administração única diária através de sonda gástrica durante 90 dias. No segundo grupo, 15 animais infectados continuaram sem tratamento, sendo o grupo controle com evolução natural da doença. O terceiro grupo foi composto por 20 animais não infectados. Os resultados apontaram que houve apenas 22 sobreviventes no primeiro grupo, comparado a 11 no segundo grupo e 9 no terceiro. 20 camundongos do primeiro grupo demonstraram histopatologia com inflamação de aspecto crônico, comparado a 9 do segundo grupo. Concluiu-se, portanto, que o tratamento também não foi satisfatório na fase crônica da doença (MOREIRA *et al.*, 1992).

Em relação às reações adversas causadas pelo ITZ, pacientes com cardiopatia possuem contraindicação devido à cardiotoxicidade induzida pelo medicamento, que pode desencadear insuficiência cardíaca ou causar progressão da cardiopatia, caso já exista em momento anterior ao uso do fármaco. A fisiopatologia dessa alteração ainda não foi elucidada (PAUL; RAWAL, 2017). Em pacientes sem histórico de cardiopatias prévias, doses acima de 400mg também podem levar à mesma adversidade. Além disso, como o ITZ inibe a 14- α -desmetilase (enzima hepática do citocromo P450 (CYP51A) citado acima), pode causar interações medicamentosas com fármacos que dependem dessa enzima para metabolização (KURN; WADHWA, 2020).

Outro antifúngico azólico testado quanto à capacidade de erradicação do tripanossoma foi o posaconazol (PNZ). Derivado do ITZ, o PNZ foi reformulado para uma molécula mais hidrofílica, garantindo melhor absorção oral. Ademais, manteve o princípio ativo do ITZ, inibindo a enzima CYP-51 e impedindo a formação de ergosterol (FRANÇA *et al.*, 2014). Em uma pesquisa de coorte prospectivo realizada na Espanha, em 2014, estudaram 78 pacientes portadores da DC tanto em fase crônica quanto aguda, devidamente randomizados, sem tratamento prévio, para averiguar a capacidade tripanocida do antifúngico. Os pacientes foram divididos igualmente em três grupos que receberam, respectivamente, PNZ oral duas vezes ao dia na dose de 100 mg, PNZ oral duas vezes ao dia na dose de 400 mg e BNZ oral duas vezes ao dia na dose de 150 mg. Após o final dos 60 dias de tratamento, os participantes ainda foram acompanhados durante 40 semanas para realização de testes

sorológicos. Os primeiros resultados coletados foram promissores: aos 14 dias de tratamento, os exames realizados demonstraram diminuição do protozoário no organismo dos pacientes. Entretanto, durante as 40 semanas seguintes, o protozoário voltou a ser identificado: através de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase- tempo real), houve positividade para *T. cruzi* em 92% dos integrantes do primeiro grupo (PNZ em baixa dose), no segundo grupo 81% (PNZ em alta dose) e apenas 38% no terceiro grupo (BNZ). Os pacientes do grupo de PNZ em baixa dose foram os primeiros em que houve falha no tratamento, obtendo resultado positivo ao final dos 60 dias de tratamento (MOLINA *et al.*, 2014). Os principais sintomas adversos observados em pacientes que utilizaram PNZ foram: neutropenia, anorexia, tontura, cefaleia, parestesia, sonolência, dores abdominais, elevação de enzimas hepáticas (TGO, TGP, fosfatase alcalina, Gama GT), exantema, astenia e febre (SCHERING-PLOUGH, 2020).

Benznidazol associado ao Itraconazol

Um ensaio realizado em Ouro Preto, no Laboratório de Doença de Chagas, buscou avaliar a associação de BNZ e ITZ no combate à infecção aguda. Para isso, foram utilizados cães jovens inoculados com a cepa do *T. cruzi*, distribuídos em quatro grupos que foram tratados respectivamente, apenas BNZ, apenas ITZ, BNZ associado a ITZ, e o quarto grupo não foi tratado. Os resultados apontaram sucesso terapêutico em todos os grupos, sendo de 50% no caso dos cães tratados no grupo 2 (ITZ), no grupo 3 60% (BNZ e ITZ) e 77% no grupo 1 (BNZ). Apesar de todos os grupos apresentarem diminuição na carga de *T. cruzi*, um animal do grupo 3 (BNZ e ITZ) foi considerado plenamente curado, segundo o critério mais atual de avaliação, visto que apresentou resultados negativos em todos os testes realizados, inclusive ELISA, tida como padrão ouro na avaliação de cura após o tratamento. Além desse, outros dois cães, um do grupo 2 (ITZ) e outro também do grupo 3 (BNZ e ITZ), também foram considerados curados conforme os critérios de cura alternativos, em que métodos parasitológicos são considerados, como exame de sangue a fresco, concentração de tripomastigotas, xenodiagnóstico e hemocultura (LANA; MARTINS-FILHO, 2015; CUNHA, 2017).

Já havia sido demonstrada a capacidade que a associação de BNZ e ITZ em diminuir a carga parasitária e/ou alcançar a cura de camundongos tratados em fase aguda de infecção. Além disso, também foram analisados os tecidos dos camundongos não curados e que alcançaram a fase crônica, havendo demonstração por histopatologia de menores danos inflamatórios quando comparados ao grupo controle não tratado ou tratado apenas com um dos dois fármacos (SILVA *et al.* 2015). É inegável que esse potencial tripanossomicida é decorrente da sinergia existente entre os fármacos devido à diferença nos mecanismos de ação, que interferem na sobrevivência do *T. cruzi* através de duas vias de inibição. Entretanto também ocorre uma interação farmacocinética capaz de prolongar a meia vida do BNZ, aumentando sua biodisponibilidade. O ITZ também funciona, portanto, como um potencializador do BNZ, havendo ainda mais benefícios em administrar ambos simultaneamente (SILVA, 2011).

Inibidor de Cruzaína: K777 e WRR-483

A cruzaína é a cisteíno-protease mais abundante no *T. cruzi*, essencial na diferenciação do parasita e desenvolvimento. Dentre as principais substâncias envolvidas na inibição, destacam-se as fluorometilcetonas, triazóis, pirimidinas, tiossemicarbonas, chalconas, benzimidazóis e vinilsulfonas. Esta última se destacou pela sua potente atividade demonstrada em ensaios *in vitro* e *in vivo*, devido à sua alta afinidade pelo sítio catalítico e elevada afinidade pela enzima alvo, além da eficácia em modelos testados em animais (LEITE, 2013). Portanto o medicamento mais estudado nessa classe é o composto K777 ou K11777, que se liga irreversivelmente à cruzaína por meio da adição nucleofílica da cisteína catalítica ao grupo vinil sulfona presente em sua estrutura (REYS, 2019).

Por um outro lado, a mencionada ligação irreversível à cruzaina gera como efeito adverso hipotermia ao se ligar a cisteíno proteases homólogas presentes no corpo de mamíferos, no caso os camundongos do tipo C3H (ENGEL *et al.*, 1998). Além disso, também foi descoberta uma importante hepatotoxicidade induzida pelo medicamento. O K777 causa elevação significativa da alanina aminotransferase (ALT), indicando lesão tecidual do fígado, o que manteve o estudo restrito apenas à fase pré-clínica. Ademais, os resultados desse estudo apontaram que a dose estimada para ser hipoteticamente consumida pelo ser humano seria uma dose oral de 10 mg/kg por 14 a 30 dias, dose essa em que haveria os efeitos colaterais citados (GARCÍA-TORRES; PÉREZ-MONTFORT, 2011). Outro medicamento dessa classe estudado foi o composto WRR-483. Trata-se de um análogo do K11777, cujo substituinte fenilalanina (substância responsável pela interação com o sítio ativo da enzima cruzaina) foi trocado pelo substituinte arginina. O WRR-483 comprovou ser um inibidor de cruzaina mais eficaz em ensaios celulares *in vitro* em culturas do *T. cruzi* e *in vivo* em camundongos que o composto K11777 (WIGGERS, 2011). Entretanto, devido às propriedades farmacocinéticas do análogo WRR-483 não serem favoráveis por não possuírem biodisponibilidade oral, pesquisas buscam desenvolver um composto derivado com igual potencial e características que facilitem sua administração, contudo o objetivo ainda não foi atingido (JONES *et al.*, 2015).

Nitroheterocíclicos: Nifurtimox e Fexinidazol

Os nitroheterocíclicos são a atual classe de escolha de medicamentos empregados no tratamento da DC aguda: aos nitroheterocíclicos pertencem tanto o BNZ – primeira linha de escolha no tratamento –, quanto o nifurtimox (NFX), segunda linha de escolha no tratamento à DC. O NFX é utilizado em casos de pacientes que não se adequam ao tratamento com BNZ, seja essa inadequação decorrente dos efeitos adversos desencadeados por ele ou, ainda, devido à presença de infecção por cepas resistentes (CASTRO; SOEIRO, 2017). Em relação ao mecanismo de ação, o NFX age de maneira semelhante ao BNZ. Atingindo concentração plasmática máxima após duas a três horas de sua administração, difere-se do BNZ porque, ao invés da formação de um radical nitro e ligação direta a macromoléculas, o NFX sofre redução a um radical nitro-ânion, que se liga então a ácidos nucleicos e inibe a enzima “Trypanothione reductase” (PUND; JOSHI, 2017). Essa enzima é responsável pela defesa antioxidante do protozoário e, quando inibida, deixa-o exposto a danosos potenciais oxidantes que acabam por causar danos suficientes que culminem em sua lise (PUND; JOSHI, 2017).

Um estudo de coorte prospectivo desenvolvido nos Estados Unidos, envolvendo o NFX, reafirmou que os efeitos adversos induzidos por ele, em comparação ao BNZ, são menos frequentes. Nesse estudo, os 53 pacientes chagásicos foram avaliados em relação à apresentação de efeitos adversos durante o tratamento com 8 a 10mg/kg de NFX, dividido em três doses diárias, durante 12 semanas. Todos os pacientes apresentaram efeitos adversos, dos quais 79% (42) finalizaram o tratamento, apresentando principalmente náuseas e anorexia. Os demais interromperam tratamento devido a sintomas como depressão, ansiedade, sonolência e erupção cutânea. Esses sintomas, apesar de menos frequentes, acabam sendo mais graves do que os comumente observados pela utilização do BNZ, que leva a sintomas mais frequentes, porém leves (FORSYTH *et al.*, 2016).

Embora o NFX geralmente seja empregado em tratamentos de fase aguda, foi apontado que o seu uso, mesmo não tendo levado à cura, causou atraso na progressão clínica da doença crônica, bem como melhora no prognóstico dos pacientes devido à demonstração de redução da carga parasitária em pacientes tratados. Ainda assim, deve-se avaliar o custo-benefício do tratamento em fase crônica, tendo em vista que muitos pacientes passam a apresentar efeitos adversos mais graves quando comparados a pacientes em fase aguda, estejam eles realizando tratamento com BNZ ou com NFX (MENDES; SILVA; MARTINS, 2016). Ademais, o Ministério da Saúde contraindica o NFX em pacientes que possuam tanto cardiopatia crônica avançada, quanto cardiopatia crônica inicial, além da forma crônica indeterminada ou digestiva em adultos. Nessas três últimas situações, o BNZ ainda é indicado (CONITEC, 2018).

Além desses nitroheterocíclicos, outro medicamento dessa mesma família vem sendo testado. Trata-se do Fexinidazol (FNZ), um fármaco aprovado em 2018 para tratamento via oral da doença do sono após demonstrar comprovada eficácia contra o *Trypanosoma brucei gambiense* (COSTA, 2018). A droga, redescoberta em 2005 pela DNDi (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*), começou a ser testada ainda em 2013 em pacientes com DC em estágio crônico, tendo esse estudo sido suspenso devido a uma falha no recrutamento de indivíduos. Entretanto, durante o seguimento realizado nos 12 meses antes da suspensão, houve eficácia na utilização do FNZ. Atualmente, o estudo vem sendo novamente conduzido na Espanha, contando com 45 pacientes crônicos tratados em esquema curto de 3, 7 e 10 dias e cujo acompanhamento vem ocorrendo desde setembro de 2018, quando foi finalizado o recrutamento dos integrantes da amostra. A fase de acompanhamento do ensaio foi concluída em 2019 e foi prevista a divulgação dos resultados para 2021 (BARREIRA; BLUM, 2018; DNDi, 2019). Francisco e colaboradores (2016) apontaram o FNZ como uma droga promissora, utilizando 30 camundongos, tratados com BNZ, NFX, FNZ e FNZ sulfone (FNZs) em contaminações agudas (14 dias) e crônicas (114 dias). O resultado apontou que as drogas FNZ e FNZ sulfone possuem capacidade curativa a curto prazo, sendo 5 dias nos camundongos de fase aguda, enquanto as drogas BNZ e NFX precisam de tempo de tratamento mais prolongado, aproximadamente 20 dias. Apesar disso, apontou que BNZ e NFX são mais eficazes na fase crônica inicial (FRANCISCO *et al.*, 2016).

O estudo responsável pela avaliação do FNZ em relação a efeitos adversos e tolerabilidade em humanos, buscando a aprovação para seu uso no tratamento da tripanossomíase africana, não evidenciou toxicidade sistêmica significativa. Foram utilizadas doses diárias de 100mg/kg a 1000mg/kg/dia. A avaliação de parâmetros cardiovasculares, respiratórios, neurais, hepáticos, plasmáticos e reprodutivos, não demonstrou alterações adversas significativas (TORREELE *et al.*, 2010).

Diamidinas aromáticas: DB75, DB569, DB1362, MB17, MB18 e MB38

A classe das diamidinas aromáticas (DAs) é composta por fármacos que atuam contra uma grande variedade de agentes dentre bactérias, fungos e protozoários (DALIRY, 2011). Seu mecanismo de ação não foi completamente elucidado, no entanto um dos mecanismos tripanocidas mais estudados é sua capacidade de ligação às sequências ricas de adenosina com timina no DNA, levando a inibição direta da replicação e transcrição de enzimas (SOEIRO *et al.*, 2005). Assim como sua ligação ao cinetoplasto, região mitocondrial formada por DNA extranuclear concentrado, levando a sua fragmentação e morte do parasita (MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA; VICKERMAN, 2004; SOEIRO *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* usando furamidina (DB75) e seu análogo, DB569, com diferentes formas e cepas do *T. cruzi*, mostraram alterações ultra estruturais mitocondriais e nucleicas (SOUZA *et al.*, 2004). Uma análise mais detalhada demonstrou morte celular programada do tipo I (apoptose) em parcela dos parasitas. Os resultados obtidos pelo análogo DB569 se mostraram mais ativos e com maior número de mortes celulares por apoptose (SOUZA *et al.*, 2006a). Ao ser analisada *in vivo*, o composto DB569 demonstrou diminuição na carga parasitária e fibrose no tecido cardíaco, semelhante aos resultados obtidos com o tratamento com BNZ, além de resultar na diminuição de lesões hepáticas e renais. O composto não diminuiu os níveis de parasitemia, no entanto o estudo indica que pode tratar-se de influência da afecção de outros tecidos e/ou seu mecanismo de ação na redução da parasitemia cardíaca foi por meio de sinergismo com células inflamatórias do coração e/ou exacerbação do potencial microbicida dessas células (SOUZA *et al.*, 2006b).

Há, também, um estudo usando o composto DB1362, cujo resultado na fase *in vitro* apresentou sua manifestação ativa contra as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, a apresentar baixa toxicidade a células hospedeiras. O uso desta diamidina foi relacionado a uma profunda alteração tanto na organização do cinetoplasto, como no núcleo do protozoário. O mesmo estudo indicou, em

animais experimentais, a redução de 40% da parasitemia e 100% de sobrevivência, utilizando somente duas doses de 25mg/kg de DB1362 (SILVA *et al.*, 2008).

O estudo de Girard *et al.* (2016) mostra a análise do efeito anti-*T. cruzi* de 3 novas diamidinas aromáticas designadas: MB17, MB19 e MB38. Os três compostos apresentaram um efeito inibitório dose dependente do crescimento de epimastigotas. Entretanto, o composto MB17 apresentou notavelmente melhores resultados, sendo o mais potente inibidor tanto da proliferação das formas epimastigotas quanto da motilidade dos parasitas. Com relação ao mecanismo de ação, o MB38 causa a perda da integridade da membrana citoplasmática, levando a um processo necrótico na célula do *T. cruzi* em sua forma epimastigota, enquanto as outras duas drogas não induzem dano a essa estrutura. Em contrapartida, tanto MB17 quanto MB19 mostraram-se eficazes na coibição do crescimento do parasita em sua fase exponencial por outro mecanismo, sendo o primeiro mais potente neste processo e estudado mais a fundo no estudo.

Os dados acerca de MB17 do estudo de Girard *et al.* (2016) demonstraram que esse fármaco se liga ao DNA genômico e ao cinetoplasto, levando à fragmentação do DNA, principalmente do cinetoplasto, e a uma diminuição importante dos níveis de ATP, o que resulta no prejuízo nos processos do ciclo celular e replicação do parasita. Este composto também foi eficaz na diminuição substancial da taxa de infectividade. Portanto esses dados demonstraram que mesmo se tratando de três compostos dentro de uma mesma classe farmacológica, esses fármacos apresentaram resultados e eficiências diferentes, sendo o composto MB17 o mais potente e promissor para futuros estudos acerca de sua ação anti-*T. cruzi* (GIRARD *et al.*, 2016).

Inibidores de esqualeno sintase: WC-9 e seus derivados

A esqualeno sintase é responsável pela catalização da redução de moléculas de farnesil difosfato que, posteriormente, originam uma molécula de esqualeno que é convertida em vários esteróis. Os inibidores da esqualeno sintase, impediram a proliferação de amastigotas intracelulares. Ao inibir essa produção, a síntese de ergosterol fica comprometida, visto que a produção de esqualeno está deficitária, impedindo a formação de uma membrana celular funcional no tripanossoma (ICHIKAWA *et al.*, 2011).

Dentre os medicamentos dessa classe, o Fenoxifenoxietiltiocianato, denominado WC-9, é o mais conhecido inibidor da esqualeno sintase, sendo comprovadamente um potente agente contra a proliferação de *T. cruzi* (LIÑARES *et al.*, 2007). Entretanto, mais recentemente, a incorporação de selênio no lugar de enxofre dentro da composição da fórmula do WC-9 trouxe um aumento dramático de sua eficácia (WC-9) como inibidores da proliferação de *T. cruzi*, tornando os derivados de selenocianato quase duas ordens de magnitude mais potentes do que as contrapartes de tiocianato com excelentes valores de índice seletivo (CHAO *et al.*, 2019). Assim sendo, pode-se dizer que os derivados contendo selênio revelaram-se inibidores extremamente potentes do crescimento de *T. cruzi* (CHAO *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

Conclui-se que há estudos promissores para melhoria no tratamento da DC. Todavia o desenvolvimento de medicamentos efetivos depende de inúmeras variáveis que devem ser contornadas visando um custo-benefício maior na aplicação do medicamento, principalmente à diminuição da quantidade de efeitos colaterais. Desse modo, a eficácia do medicamento não é a única variável que deve ser considerada no balanceamento da aplicação de medicamentos. Muitos princípios ativos que se demonstraram eficazes no combate ao patógeno acabaram causando, a longo prazo, danos às células do hospedeiro e foram conseqüentemente descartados. Ademais, o período de tratamento e conseqüentemente o aparecimento de efeitos colaterais, é um viés a ser contornado, visto que o próprio BNZ, medicamento de escolha no tratamento de primeira linha do Brasil para combater a doença (CASTRO; DIAS DE TORANZO, 1988) possui índice de abandono de tratamento de dois

em três pacientes. As atuais pesquisas procuram, portanto, a diminuição do período de tratamento buscando aumentar o êxito. Estudos demonstraram grande eficácia e baixa toxicidade, inclusive já sendo administrados em alguns países em fases de teste em humanos com sucesso. Apesar disso, esses ensaios demandam grande capital financeiro para que continuem sendo desenvolvidos, acarretando um viés de difícil contorno no Brasil e outros países endêmicos. Desse modo, a alta complexidade do *Trypanosoma cruzi*, somada a essas variáveis, lentifica a elaboração de novas estratégias farmacológicas.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, J. P. O.; TESTON, A. P. M.; ZANUSSO JÚNIOR, G. Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas: Um Antigo Problema De Saúde Pública. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, p. 91–96, 2014.

BARREIRA, F.; BLUM, B. **Informativo n.º 8: Atualização dos estudos Clínicos da DNDi: BENDITA e FEXI 012**. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019.

CAMARA, E. J. N. *et al.* Elevated IL-17 levels and echocardiographic signs of preserved myocardial function in benznidazole-treated individuals with chronic Chagas' disease. **International Journal of Infectious Disease**, v. 79, n. 2019, p. 123-130, 2018.

CARDOSO, C. S. *et al.* Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: nih sami-trop cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, e0006814, 2018.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas'disease). **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 19-33, 1988.

CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C. **Drogas tripanossomicidas: Estudos pré-clínicos da doença de Chagas**, 2017.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamica y Farmacocinetica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CHAO, M. N. *et al.* Further insights of selenium-containing analogues of WC-9 against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1350-1361, 2019.

CHAO, M. N. *et al.* Selenium-containing analogues of WC-9 are extremely potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6435-6449, 2017.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas**. Brasília, 2018.

COSTA, C. H. N. Aprovado primeiro tratamento exclusivamente oral para doença do sono. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (SBMT)**, p. 1-1, 2018.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p.124-131, 2012.

CUNHA, E. L. A. **Avaliação do Tratamento com Benznidazol, Itraconazol e sua Associação na Fase Aguda da Doença de Chagas Experimental no Modelo Cão**. 2017. 71f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

DALIRY, A. **Atividade, seletividade e mecanismos de ação de diamidinas aromáticas e análogos sobre *Trypanosoma cruzi*: um enfoque sobre o kDNA**. 2011. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

DAVANÇO, M. G. **Farmacocinética do Benznidazol Administrado em Coelhos na Forma de Comprimidos de Liberação Imediata e Comprimidos de Liberação Prolongada**. 2015. 152f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2015.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. Spe, p. 77-86, 2016.

DIAS, L. C. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Epidemiologia. In: **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral**, Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, 1997.

DNDI. **Novo tratamento para Crianças com Doença de Chagas aprovado pela ANVISA**, 2011.

DNDI. **Fexinidazole for Chagas**, 2019.

ENGEL, J. C. *et al.* Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998.

FIUZA, L. F. A. **Identificação de Novos Compostos Inibidores da Biossíntese de Ergosterol como Potenciais Fármacos Para Terapia da Doença de Chagas**. 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

FORSYTH, C. J. *et al.* Safety profile of Nifurtimox for treatment of Chagas Disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 8, p. 1056–1062, 2016.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1-11, 2016.

FRANÇA, R. R. F. *et al.* Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14 α -demethylase Against *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1483-1516, 2014.

GARCÍA-TORRES, I.; PÉREZ-MONTFORT, R. Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la Enfermedad de Chagas. **Revista de Educación Bioquímica**, v. 30, n. 2, p. 68-81, 2011.

GIRARD, R. M. B. M. *et al.* An aromatic diamidine that targets kinetoplast DNA, impairs the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*, and diminishes trypomastigote release from infected mammalian host cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5867-5877, 2016.

ICHIKAWA, M. *et al.* Discovery of a new 2-aminobenzhydrol template for highly potent squalene synthase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1930-1949, 2011.

JONES, B. D. *et al.* Synthesis and evaluation of oxyguanidine analogues of the cysteine protease inhibitor WRR-483 against cruzain. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 77-82, 2016.

KÖBERLE, F. Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. **Advances In Parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968.

KURN, H.; WADHWA, R. Itraconazole. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

LANA, M.; MARTINS-FILHO, O. A. Revisiting the posttherapeutic cure criterion in Chagas Disease: time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts? **Biomed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1-10, out. 2015.

LEITE, M. **Triagem e seleção de inibidores da enzima cruzaina do parasita *Trypanosoma cruzi***. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

LIÑARES, G. G. *et al.* Fluorine-containing aryloxyethyl thiocyanate derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* proliferation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 18, p.5068-5071, 2007.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da Doença de Chagas humana. In: JOÃO CARLOS PINTO DIAS (Org.). **Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997.

LOPES, J. N. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 523-531, dez. 1978.

LOURDES, R. A. **Aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares da resposta dependente do receptor do tipo Toll 9 na infecção experimental por cepas de diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi***. 2013. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MAGALHÃES, A. D. **Subproteômica de *Trypanosoma cruzi*: Proteínas Básicas e Fosfoproteoma**. 2010. 119 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MENDES, L. L.; SILVA, M. S.; MARTINS, A. L. O. Treatment of chronic phase of Chagas Disease: systematic review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 4, p. 1-1, 2016.

MOLINA, I. *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**. New England, v. 370, p. 1899-1908, 2014.

MOREIRA, A. A. B. *et al.* Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 2, n. 34, p. 177-180, 1992.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 1 set. 2004.

MORILLO, C. A. *et al.* Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

NOXAFIL. M. C. B. **Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda**, 2020.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Neglected Infectious Diseases: Chagas Disease**, 2017.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 7, n. 1, p. 13-23, 1957.

PAUL, V.; RAWL, H. Cardiotoxicity with itraconazole. **BMJ Case Reports**, Illinois, abr. 2017.

PAVAN, T. B. S. *et al.* Hepatic changes by benznidazole in a specific treatment for Chagas disease. **Plos One**, v. 13, n. 7, p. 1-1, 2018.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4570-4590, 2009.

PUND, S.; JOSHI, A. Nanoarchitectures for neglected tropical protozoal diseases: Challenges and state of the art. In: GRUMEZESCU, A. M. **Nano and microscale drug delivery systems: Design and fabrication**. Bucareste: Elsevier, 2017.

REYS, C. D. C. **Síntese e caracterização química de dipeptidilnitrilas como inibidores da enzima cruziína visando atividade antiparasitária no *Trypanosoma cruzi***. 2019. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

ROCHAGAN, L. G. L. Recife: LAFEPE, 2018. Bula de remédio.

ROSSI, M. A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **American Heart Journal**, v. 120, n. 1, p. 233-236, 1990.

SILVA, A. C. O. *et al.* **Resultado da associação de dois quimioterápicos Anti-*Trypanosoma cruzi*: Benznidazol e Itraconazol no tratamento de camundongos infectados com a cepa colombiana do *Trypanosoma Cruzi***. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 51., 2015, Fortaleza. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2015.

SILVA, C. F. *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p.3307-3314, 2008.

SILVA, R. M. **Avaliação da associação de benzonidazol e itraconazol no tratamento de camundongos infectados com clones de *Trypanosoma cruzi* de grupos genéticos distintos: eficácia terapêutica e farmacocinética.** 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

SOEIRO, M. N. C. *et al.* Aromatic diamidines as antiparasitic agents. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14, n. 8, p.957-972, 2005.

SOUZA, E. M. *et al.* Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 593-600, 2004.

SOUZA, E. M. *et al.* Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 75-79, 27, 2006a.

SOUZA, E. M. *et al.* Trypanocidal activity of the phenyl-substituted analogue of furamidine DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 610-614, 2006b.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* CYP51: Uma Boa Ideia? **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 539-575, 2015.

TORREELE, E. *et al.* Fexinidazole – A new oral nitroimidazole drug candidatee clinical development for the treatment of sleeping sickness. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, e923, 2010.

VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment. **Annals Of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724-734, 2006.

WIGGERS, H. J. **Integração de métodos *in silico* e *in vitro* para o planejamento de inibidores da enzima cruzaina.** 2011. 177f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

WILSON, W. *et al.* Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 4, p. 389-408, 2005.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcellular Biochemistry**, Springer New York, p. 82-91, 2008.