

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Letícia dos Santos Petry

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E DA SEGURANÇA
TERAPÊUTICA DE UM COMPOSTO BENZOFUROXANO DERIVADO**

Santa Maria, RS
2020

Letícia dos Santos Petry

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E DA SEGURANÇA TERAPÊUTICA
DE UM COMPOSTO BENZOFUROXANO DERIVADO**

Tese de doutorado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof^{ra}: Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS
2020

Petry, Leticia dos Santos
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E DA SEGURANÇA
TERAPÊUTICA DE UM COMPOSTO BENZOFUROXANO DERIVADO /
Leticia dos Santos Petry.- 2020.
80 p.; 30 cm

Orientador: Silvia Gonzalez Monteiro
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Trypanosoma cruzi 2. Doença de Chagas 3.
Benzofuroxanos derivados I. Gonzalez Monteiro, Silvia
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a Leticia dos Santos Petry. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

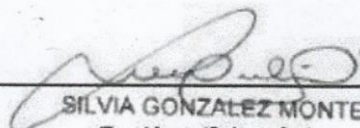
Fone: (55) 999 735652

Leticia dos Santos Petry

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E DA SEGURANÇA
TERAPÊUTICA DE UM COMPOSTO BENZOFUROXANO DERIVADO**

Tese de doutorado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Medicina Veterinária**

Aprovado em 4 de agosto de 2020:



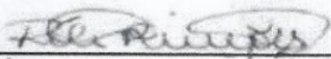
SÍLVIA GONZALEZ MONTEIRO (UFSM)
(Presidente/Orientador)



DANIEL ROULIM STAINKI (UFSM)



MICHEL MANSUR MACHADO (UNIPAMPA)



ROLI RODRIGUES SIMÕES (FATENP)



LUCIANO DORNELLES (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao amor da minha
vida, a pessoa que mudou minha forma de
ver o mundo e que me mostrou o que é o

amor

Meu filho, Miguel.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, que mesmo sem saber dizer uma palavra, sempre soube me reconfortar com o seu “sorriso banguela” e que, mesmo com meus muitos momentos de ausência sempre soube o quanto eu o amo.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e principalmente me ajudaram, com todo o carinho do mundo a cuidar do meu filho Miguel enquanto eu me dedicava a tese.

Ao Bruno e a toda família dele, em especial a tia Mosa que também ajudou a cuidar do Miguel enquanto me dedicava a tese.

A minha irmã, que sempre me incentivou, me apoiou e me escutou em todos os momentos.

A minha orientadora Professora Dra. Silvia Gonzalez Monteiro pela confiança depositada durante todo o doutorado, e por todos os ensinamentos, carinho e puxões de orelha.

Ao Professor Dr. Daniel Roulim Stainki que sempre esteve conosco no laboratório, nos ensinando, ajudando e também pelos puxões de orelha e carinho.

A Maria, secretária da pós, que sempre esteve disposta a me ajudar quando precisei.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório, em especial aos estagiários e, principalmente ao “meu” estagiário Lucas Alexandre Farias de Souza que sempre esteve pronto a me ajudar.

Ao Professor Luciano que me auxiliou muito neste trabalho e é responsável pelo composto testado.

Ao João que sintetizou o composto e me ajudou muito, além de sanar diversas dúvidas que surgiram ao longo deste trabalho.

Ao Professor Michel, da UNIPAMPA, que foi responsável pelas análises referentes a citotoxicidade e genotoxicidade do composto teste, além de me auxiliar sempre que as dúvidas surgiam.

A todos que participaram deste trabalho, obrigada pelo carinho, dedicação e companheirismo.

Ao meu amigo, Dionatan, que mesmo longe esteve perto, sempre me apoiando e me incentivando.

A minha amiga, Camila, que me acompanha desde o tempo da faculdade e sempre esteve disposta a me ajudar.

Ao CNPq, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa a mim concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E DA SEGURANÇA TERAPÊUTICA DE UM COMPOSTO BENZOFUROXANO DERIVADO

AUTOR: Letícia dos Santos Petry
ORIENTADORA: Silvia Gonzalez Monteiro

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente a família Trypanosomatidae, afeta mais de 8 milhões de pessoas no mundo. Este parasito possui ciclo biológico heteroxeno e passa por diferentes formas evolutivas no interior dos seus hospedeiros. A doença de Chagas representa um grande problema de saúde pública no Brasil e na América Latina, sendo descrita como uma das doenças mais negligenciadas do mundo. Mesmo após mais de cem anos de seu descobrimento, esta enfermidade não possui um tratamento seguro e totalmente eficaz. Atualmente, apenas dois medicamentos estão disponíveis para o tratamento, o Benznidazol e o Nifurtimox, contudo, ambos apresentam diversos efeitos colaterais e são tóxicos. Dessa forma, a busca por novos fármacos é necessária, sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar um derivado benzofuroxano sintetizado, avaliando sua citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*, bem como, avaliar a sua atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* frente ao *T. cruzi*. Para isso, primeiramente foi realizada a síntese do composto, que foi denominado conforme IUPAC como “5-((5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol-N-óxido” e como composto EA2 para este trabalho. O processo de síntese foi realizado no LabSelen Nanobio (UFSM), laboratório que atuou em parceria neste estudo. O composto foi caracterizado por RMN de ¹H e de ¹³C, foi realizada a análise da citotoxicidade pelo método de exclusão por azul de tripam, o ensaio cometa alcalino foi realizado para avaliar a genotoxicidade e para avaliar a mutagenicidade foi realizado o teste de micronúcleo, para estes testes o composto foi diluído em três diferentes concentrações: 10 µM/mL, 50 µM/mL e 100 µM/mL. Nas concentrações testadas, o composto não apresentou atividade mutagênica, contudo, apenas a menor concentração não apresentou efeitos citotóxicos e genotóxicos. Para o teste *in vitro* frente a formas epimastigostas de *T. cruzi*, o composto foi diluído em três diferentes concentrações (0,25%, 0,50% e 1%) e avaliado 24, 48 e 72 horas após a incubação. O composto EA2 apresentou atividade tripanocida *in vitro* nas três concentrações testadas. Após este teste foi realizado o teste *in vivo*. O composto foi testado em três diferentes doses: 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg e os animais foram divididos em dez grupos (5 animais/grupo), sendo quatro grupos de animais não infectados (A, G, H, I) e seis grupos de animais infectados (B, C, D E, F, J). Os grupos B e J eram os controles negativo e positivo, respectivamente. Os grupos G, H e I foram utilizados a fim de comprovar que o composto não era tóxico para animais sadios. O composto EA2 não apresentou eficácia curativa, contudo, foi capaz de retardar o início da parasitemia nos animais tratados, bem como, reduzir significativamente a contagem de parasitos nos grupos D e E, além disso, o composto não induziu a alterações nos parâmetros hematológicos, hepáticos e renais em animais não infectados, demonstrando, neste estudo, não ser tóxico, contudo mais testes são necessários a fim de comprovar a segurança do composto EA2 para a saúde, visto que, este foi o primeiro estudo com a molécula sintetizada.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Composto EA2.

ABSTRACT

EVALUATION OF TRIPANOCIDAL ACTIVITY AND THERAPEUTIC SAFETY OF A BENZOFUROXAN COMPOUND DERIVED

AUTHOR: Letícia dos Santos Petry
ADVISER: Silvia Gonzalez Monteiro

Chagas disease affects more than 8 million people worldwide and is caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, which belongs to the Trypanosomatidae family. This parasite has a heteroxenous biological cycle with different evolutionary forms within its hosts. Chagas disease is a major public health concern in Brazil and Latin America and has been described as one of the most neglected diseases in the world. Even after more than a hundred years since its discovery, there is no safe and totally effective treatment for this disease; only two drugs, benznidazole and nifurtimox, are currently available to treat Chagas disease. Both drugs are highly toxic and have several side effects. In addition, the use of nifurtimox is prohibited in Brazil. Thus, the search for new drugs for this disease is necessary. The objectives of this study were to synthesize a benzofuroxane compound and evaluate its cytotoxicity and genotoxicity *in vitro* and to evaluate its trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo* against *T. cruzi*. 5-((5-(4-Methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbonyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole-*N*-oxide was synthesized by our collaborator, LabSelen Nanobio (UFMS), and is referred to as compound EA2. The compound was characterized by ¹H and ¹³C NMR. Its cytotoxicity was determined using the trypan blue exclusion method, and its genotoxicity was determined using the alkaline comet assay. Mutagenicity was evaluated using the micronucleus test. For these tests, three different concentrations of EA2 were used: 10 μM/mL, 50 μM/mL, and 100 μM/mL. The compound did not show any mutagenic activity at any of the concentrations tested. Moreover, only 10 μM/mL EA2 did not show cytotoxic or genotoxic effects. For the *in vitro* test against epimastigote forms of *T. cruzi*, the compound was used at three different concentrations (0.25%, 0.50%, and 1%) and the effects were evaluated after 24, 48, and 72 h of incubation. EA2 showed trypanocidal activity *in vitro* at all three concentrations. Subsequently, an *in vivo* test was performed using three different doses: 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg. Test animals were divided into ten groups (5 animals per group): four groups consisting of uninfected (A, G, H, I) and six groups of infected (B, C, D, E, F, J) animals. Groups B and J were the negative and positive controls, respectively. Groups G, H, and I were used to demonstrate that the compound was not toxic to healthy animals. EA2 did not show any curative effects *in vivo*, but it was able to delay the onset of parasitemia in the treated animals as well as significantly reduce the parasite count in groups D and E. In addition, the compound did not alter hematological parameters or affect the liver and kidneys of uninfected animals, indicating that EA2 is not toxic. Nevertheless, further tests are necessary to prove the therapeutic safety of EA2.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Compound EA2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> : (a) forma tripomastigota, (b) forma amastigota (c) forma epimastigota. Fonte: FIOCRUZ.....	13
Figura 2:	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> . Fonte: RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010.....	14
Figura 3:	Principais gêneros de Triatomíneos vetores do <i>T. cruzi</i> : (a) <i>Triatoma</i> sp., (b) <i>Rhodnius</i> sp. (c) <i>Panstrongylus</i> sp. Fonte: Atlas iconográfico de triatomíneos do Brasil (2014).....	16
Figura 4:	Distribuição de casos autorreferidos para a doença de Chagas, segundo o município de residência, dezembro/2015, Brasil. Fonte: Boletim epidemiológico, Ministério da Saúde, 2020.....	20
Figura 5:	Eventos fisiopatológicos da doença de Chagas. Fonte: OPAS, 2007.....	24
Figura 6:	Estruturas moleculares dos fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas. (a) Molécula de Nifurtimox; (b) Molécula de Benznidazol. Fonte: SILVA JR, et al., 2014.....	25
Figura 7:	Reações adversas provocadas pelo tratamento com Benznidazol. (a) Placas eritematosas, (b) dermatite esfoliativa, (c) erupção cutânea, (d) edema das extremidades. Fonte: De PONTES et al., 2010.....	27
Figura 8:	Estrutura química dos derivados benzofuroxanos <i>N</i> -óxido-benzo[1,2- <i>c</i>]1,2,5-oxadiazol). Fonte: DIAS et al., 2009.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BZ	Benznidazol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
IC	Insuficiência cardíaca
Nfx	Nifurtimox
OMS	Organização mundial da saúde
ON	Óxido nítrico
RA	Reações adversas
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.2 Transmissão.....	15
2.3 Doença de Chagas.....	18
2.3.1 Breve histórico e panorama atual.....	18
2.3.2 Formas da doença de Chagas e diagnóstico.....	20
2.3.2.1 Fase aguda.....	20
2.3.2.2 Fase crônica.....	22
2.4 Tratamento.....	24
2.5 Derivados Benzofuroxanos.....	28
3. ARTIGOS	31
3.1 Artigo I: CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF A BENZOFUROXAN DERIVATIVE, <i>IN VITRO</i>	31
3.2 Artigo II: <i>IN VITRO</i> and <i>IN VIVO</i> TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF A BENZOFUROXAN DERIVATIVE AGAINST <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
4. DISCUSSÃO	67
5. CONCLUSÃO	69
5. REFERÊNCIAS	70

APRESENTAÇÃO

As metodologias e resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob forma de dois artigos científicos que, demonstram a síntese de uma nova molécula, um composto derivado dos benzofuroxanos que foi estudado para verificar a ação sobre *T. cruzi*. Este documento está organizado conforme o manual de teses e dissertações da Universidade Federal de Santa Maria (MDT-2015-UFSM). As seções MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, encontram-se nos próprios artigos.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, no final deste documento, se referem apenas a INTRODUÇÃO e a REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta tese. O artigo I (CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF A BENZOFUROXAN DERIVATIVE, *IN VITRO*) está nas normas da revista “*Química Nova*”. O artigo II (*IN VITRO* and *IN VIVO* TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF A BENZOFUROXAN DERIVATIVE AGAINST *Trypanosoma cruzi*) está nas normas da revista “*Experimental Parasitology*”.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi*, é uma enfermidade endêmica em mais de 21 países do continente americano, sendo descrita como uma doença negligenciada, visto que, atinge principalmente populações com poucos recursos financeiros e dessa forma, não atraem a atenção da indústria farmacêutica. Além disso, segundo a Fundação Oswaldo cruz, a doença de Chagas pode ser chamada de “doença silenciosa ou silenciada” não apenas por apresentar curso clínico lento e muitas vezes assintomático, mas também por ser uma doença que afeta populações mais pobres, que não tem voz política ou acesso à serviços de saúde.

Os fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas são tóxicos e possuem diversos efeitos colaterais, como, náuseas, vômitos, dermatite esfoliativa, exantema, cefaléia, urticária, fraqueza muscular, dentre outros. Em um estudo realizado por Pontes e colaboradores (2010), analisando as reações adversas (RA) produzidas pelo tratamento com o Benznidazol (Bz), os autores relataram que 87,5% dos pacientes tratados apresentam algum tipo de RA, sendo que, destes, 28,57% interromperam o tratamento. Além disso, os tratamentos disponíveis não apresentam efeito curativo na fase crônica da doença (CASTRO, 2006). Dessa forma, a busca por novos fármacos é necessária.

Os derivados dos benzofuroxanos (N-óxido-benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol) são moléculas capazes de gerar espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs), sendo que, a principal espécie reativa gerada é o óxido nítrico (ON) (JOVENÉ et al, 2013). O ON é um importante mensageiro que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo descrito como um potente agente antimicrobiano (BOIANI et al., 2008). Diversos grupos de estudo têm avaliado a atividade dos derivados benzofuroxanos frente a protozoários como *T. cruzi* e *Leishmania* sp. e os resultados têm sido bastante promissores. Estes estudos baseiam-se na modificação da cadeia lateral do núcleo furoxânico e grupamentos ligados ao anel benzofuroxânico (AGUIRRE et a., 2005; CERECETTO et al., 2005; OLEA-AZAR et al., 2003; BOIANI et al, 2008; CASTRO et al., 2009). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar um derivado de benzofuroxano sintetizado, frente ao *T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, bem como, avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* do composto em cultura de leucócitos e também avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas induzidas pelo tratamento com o composto em animais sadios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado, pertencente a ordem Kinetoplastida e família Tripanosomatidae. Morfologicamente, o protozoário apresenta três formas evolutivas (Figura 1) identificadas por microscopia ótica, de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo: amastigota, epimastigota e tripomastigota (MARTINS et al., 2012).

As formas amastigotas, encontram-se nos tecidos dos vertebrados e são caracterizadas por apresentarem formato arredondado ou ovalado, aproximadamente 5 µm de comprimento, núcleo grande, cinetoplasto visível, flagelo reduzido/inaparente e ausência de membrana ondulante. As formas tripomastigotas, localizam-se tanto no hospedeiro vertebrado (tripomastigota circulante), quanto no hospedeiro invertebrado (tripomastigota metacíclico) e caracterizam-se por apresentar forma de “C”. A forma metacíclica possui em torno de 17 µm e a forma circulante aproximadamente 25 µm de comprimento, membrana ondulante e flagelo livre, cinetoplasto volumoso localizado próximo ao flagelo (TELLERIA et al., 2006). A forma epimastigota se caracteriza pelo cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido, com 20 a 40 µm de comprimento (TYLER; ENGMAN, 2001; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Até pouco tempo atrás acreditava-se que apenas a forma tripomastigota metacíclica era capaz de infectar hospedeiros mamíferos, no entanto, em 2017, em trabalho publicado por Kessler e colaboradores, foi descrito que a forma epimastigota recém diferenciada também é capaz de infectar hospedeiros mamíferos, quebrando um paradigma centenário.

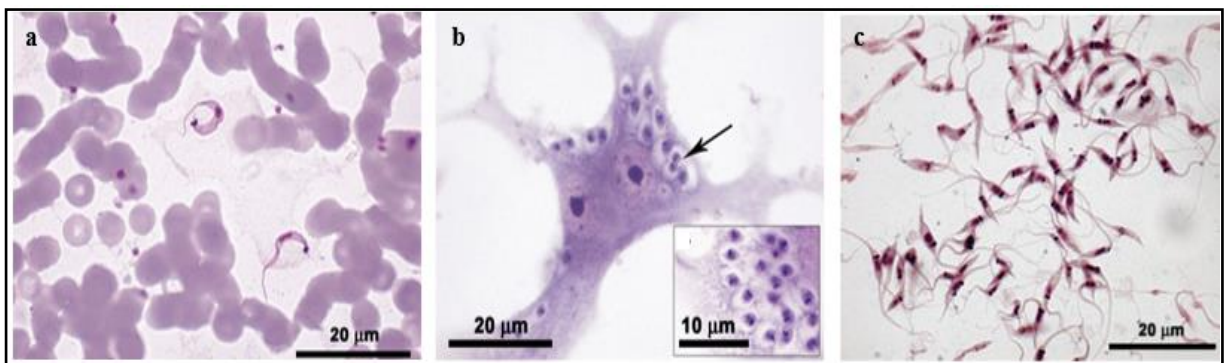


Figura 1: Formas evolutivas de *T. cruzi* (a) forma tripomastigota circulante, (b) forma amastigota, (c) forma epimastigota. Fonte: FIOCRUZ.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxeno, envolvendo um hospedeiro invertebrado (Triatomíneo), que atua como vetor do parasito e, uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, sendo o homem o hospedeiro definitivo mais relevante. Ao ser ingerido pelo inseto vetor, o *T. cruzi*, passa por uma série de transformações ao longo do tubo digestivo do inseto. As formas sanguíneas ingeridas diferenciam-se em epimastigotas, os quais passam a se multiplicar por divisão binária e colonizam o tubo digestivo do triatomíneo. Ao atingirem a porção posterior do intestino, em especial a ampola retal, os epimastigotas ficam aderidos ao epitélio intestinal, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos (metacliclogênese), os quais são eliminados juntamente com as fezes e urina quando o triatomíneo realiza o repasto sanguíneo (BRENER et al., 2000). Uma vez infectado, o inseto permanecerá assim por toda a vida, contudo, excepcionalmente a infecção pode ser eliminada a longo prazo (DIAS et al., 2006).

As formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas junto com as fezes e urina do triatomíneo, penetram no local da picada ou por qualquer solução de continuidade, o parasito não penetra na pele íntegra do hospedeiro vertebrado. Através da circulação vão em direção aos tecidos, onde diferenciam-se em amastigotas. O parasito multiplica-se no interior da célula e, após alguns dias, diferenciam-se novamente em tripomastigotas que rompem a célula infectada e retornam a circulação, indo em direção a outros tecidos ou reiniciando o ciclo de transmissão, caso um inseto vetor ingira as formas tripomastigotas circulantes ao realizar o repasto sanguíneo (BRENER, 2000; COURA; DIAS 2009).

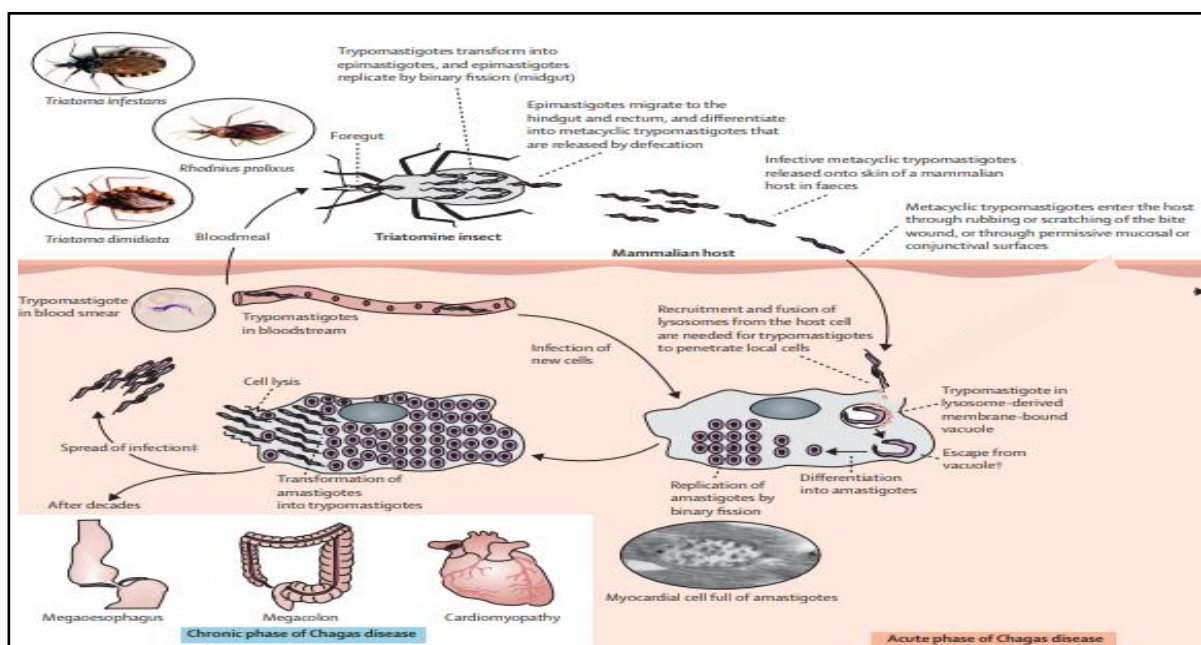


Figura 2:Ciclo biológico do *T. cruzi*. Fonte: RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010.

O comportamento do *T. cruzi* não é homogêneo e, varia de acordo com a cepa. Sendo que, diferentes cepas podem exibir características biológicas distintas, como taxa de crescimento, curvas de parasitemia, virulência, resistência ao tratamento, perfil antigênico e tropismo tecidual, podendo afetar células musculares, cardíacas ou digestivas (ANDRADE et al., 1999). A morfologia pode variar de uma cepa para outra, por exemplo, a cepa Y é mais delgada que a cepa CL (BUSCAGLIA; DINOIA, 2003).

Na infecção com a cepa Y verifica-se elevado macrofagotropismo, alta virulência, susceptibilidade ao tratamento (Nifurtimox e Benznidazol), pico parasitêmico do 7° ao 12° dia pós infecção, as cepas 21 SF e Peruana apresentam curso parasitêmico mais lento e miotropismo por células musculares cardíacas, a cepa Famema apresenta baixa parasitemia, baixa virulência, pico parasitêmico ao redor do 20° dia pós infecção e miotropismo por células musculares cardíacas, enquanto a cepa Colombiana é altamente resistente ao tratamento, apresenta curso lento, com o pico parasitêmico ao redor do 30° dia pós infecção e nítido tropismo por células musculares esqueléticas (ANDRADE et al., 1985; DEVERA et al., 2002; PERINETTI et al., 2003).

2.2. Transmissão

O mecanismo tradicional de transmissão do *T. cruzi* é a via vetorial, que ocorre através do contato das fezes e urina do inseto vetor com a pele lesionada do hospedeiro/reservatório no momento em que o triatomíneo realiza o repasto sanguíneo. Existem mais de 130 espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi*. No Brasil, atualmente, contabiliza-se a existência de 65 espécies, sendo *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus*, as cinco principais espécies que têm, ou tiveram, participação relevante na transmissão domiciliar (SILVEIRA; FEITOSA; BORGES 1984; GALVÃO et al., 2003; GALVÃO, 2014). Em 2006 o Brasil recebeu da OMS certificação da Interrupção da Transmissão da Doença de Chagas pelo principal vetor domiciliado, *T. infestans*, contudo, de acordo com o Boletim Epidemiológico da Secretária de Vigilância em saúde do Ministério da Saúde, no período de 2007 a 2011, identificou-se a persistência de focos de *T. infestans* em quatro municípios do Estado da Bahia (Itaguaçu da Bahia, Ibipeba, Novo Horizonte e Tremedal) e em 12 municípios do Rio Grande do Sul (Ajuricaba, Alegria, Coronel Barros, Doutor Maurício Cardoso, Giruá, Humaitá, Ijuí, Independência, Porto Mauá, Salvador das Missões, Santo Cristo e São José do Inhacorá) (SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os triatomíneos (Figura 3), são insetos pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, possuem tamanho variando de 0,5 a 4 cm de comprimento, estritamente hematófagos, apresentam em geral hábitos noturnos e metamorfose parcial (cinco estágios evolutivos, adquirindo asas apenas no último – adulto). Vivem, em média, entre 1 e 2 anos, com evolução de ovo a adulto de 3 a 8 meses. São insetos lentos, pouco agressivos, de voo difícil, grande capacidade reprodutora e uma enorme capacidade de resistência ao jejum (COURA; DIAS, 1997; GALVÃO, 2014).

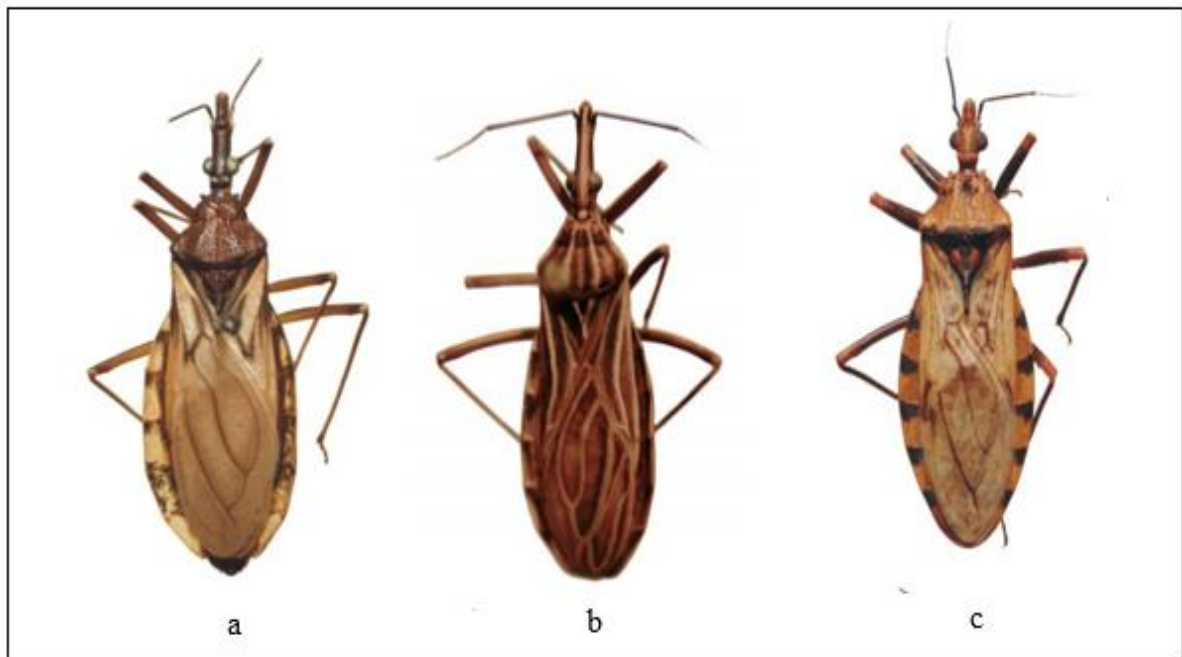


Figura 3: Principais gêneros de Triatomíneos vetores do *T. cruzi*: (a) *Triatoma* sp., (b) *Rhodnius* sp., (c) *Panstrongylus* sp. Fonte: Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (2014)

A capacidade vetorial dos triatomíneos depende de alguns de seus atributos, como maior grau de antropofilia e metaciclogênese (produção de grande número de formas infectantes de *T. cruzi*), e de um menor tempo entre repasto sanguíneo e dejeção, pois se o triatomíneo defecar no ninho, a transmissão do *T. cruzi* não ocorre (MONTEIRO, 2017).

Além da via vetorial, o *T. cruzi* pode ser transmitido por via oral, transfusional, transplacentária, acidental e através de transplante de órgãos. A via oral ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com o protozoário, como o leite materno de mãe infectada, carne crua ou mal cozida de animais infectados, ou ainda, através da ingestão de alimentos contaminados, quando os triatomíneos depositam suas fezes infectadas na superfície de alimentos ou ingredientes alimentícios ou, ainda, quando eventualmente, os insetos são triturados durante o processamento dos alimentos, como açaí e a cana-de-açúcar. Atualmente,

esta é a principal forma de transmissão da doença de Chagas aguda na América Latina (PASSOS et al., 2012; SOUZA; POVOA, 2016).

Experimentos testando a infecção oral por *T. cruzi* em camundongos mostraram que tripomastigotas metacíclicos são capazes de invadir o epitélio gástrico como porta de entrada para infecção sistêmica. As formas metacíclicas não são digeridas pelo suco gástrico, visto que, expressam em sua superfície moléculas do tipo mucina, altamente glicosiladas e extremamente resistentes à degradação proteolítica. No entanto, algumas cepas são mais eficientes em infectar os hospedeiros pela via oral, enquanto outras, são menos eficientes. Cepas que contém a molécula de superfície gp90 tem sua capacidade infectiva aumentada quando em contato com o ácido clorídrico, resultando em altos níveis de parasitemia e elevada mortalidade em camundongos infectados experimentalmente (SILVA-DOS-SANTOS, et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2018).

A transmissão transfusional, é mais comum em países não endêmicos, contudo, várias estratégias têm sido adotadas para prevenção e controle desta via de transmissão e, países como Estados Unidos, Canadá, Espanha, França, Suíça e Austrália já introduziram estratégias de triagem sorológica no processo de triagem de candidatos à doação de sangue (ANGHEBEN et al., 2015). Esta via de transmissão depende de alguns fatores como a presença do protozoário no sangue ou no componente transfundido, tipo de produto sanguíneo infectado transfundido, estado imunológico do receptor, qualidade na triagem clínico-epidemiológica, sensibilidade dos testes sorológicos empregados no processo de triagem dos candidatos à doação (DIAS; SCHOFIELD, 1998; COURA; DIAS, 2009; MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA 2011).

A transmissão congênita pode ocorrer em qualquer trimestre da gestação, sendo mais comum entre a 22^o e a 37^o semana e, parece depender de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro. Além disso, pode ocorrer durante a passagem no canal do parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (REICHE et al., 1996). A fase aguda da infecção materna apresenta maior risco de transmissão que a fase crônica, uma vez que, a parasitemia é mais elevada e persistente. A infecção congênita pode ocorrer em 71% dos recém-nascidos de mães com infecção aguda durante a gravidez e em 1,6% na fase crônica de doença (REICHE et al., 1996; MORETTI et al., 2005).

A transmissão acidental pode ocorrer em diferentes contextos, como em ambientes laboratoriais e hospitalares, nos quais pode ocorrer contato com sangue contaminado de paciente ou animais de laboratório infectados, contato com cultura de tecidos ou, ainda em ações de captura de triatomíneos, por exemplo. São diversos os fatores de risco na transmissão acidental variando desde a falta de atenção, desconhecimento dos riscos, mau uso de

equipamentos de proteção individual, instalações ou equipamentos inadequados e má iluminação (DIAS; AMATO NETO, 2011).

A transmissão através de transplante de órgãos, ocorre quando o receptor recebe órgão de doador infectado pelo *T. cruzi*, casos já foram documentados em transplantes de coração, fígado, medula óssea, pâncreas e rim (CHOCAIR et al.,1981; DIAS; AMATO NETO; 2011). Neste caso, o paciente transplantado apresenta a forma aguda da doença com febre, nódulos cutâneos eritematosos, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, mialgias, cefaleia (GONTIJO; SANTOS, 2009). No Brasil, a portaria 2.600 de 2009, que aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes, estabelece que a sorologia para a infecção por *T. cruzi* é obrigatória e a “equipe informará se aceita” rins, fígado, pâncreas e pulmão, uma vez que, o coração de pacientes chagásicos não pode ser doado. Quando o doador é sadio e o receptor é positivo para doença de Chagas, há risco de reativação da cepa, devido ao tratamento com imunossupressores (DIAS, 1997; PINAZO et al., 2011).

2.3.Doença de Chagas

2.3.1.Breve histórico e panorama atual:

A doença de Chagas, conhecida também como tripanossomíase americana, é uma importante zoonose resultante da infecção pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermidade existe há milhões de anos como uma enzootia de animais silvestres e há indícios da infecção humana pelo protozoário há pelo menos cinco mil anos A.C, identificadas em múmias no deserto do Atacama (Chile). Contudo, este parasito foi identificado pela primeira vez em 1909, pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, o qual havia sido designado para controlar a infecção por malária nos trabalhadores envolvidos na construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, na região norte de Minas Gerais. Chagas teve sua atenção despertada por um inseto hematófago que se proliferava nas frestas das casas de pau-a-pique, os quais eram chamados de barbeiros pela população local, pois ao se alimentarem apresentavam predileção por sugar o sangue da face. Ao examinar estes insetos, Chagas, verificou a presença de numerosos flagelados em seu conteúdo intestinal (CHAGAS, 1909).

Chagas enviou alguns exemplares dos hemípteros ao instituto do qual fazia parte. O então diretor do instituto, Dr. Oswaldo Cruz, infectou um macaco da espécie *Callithrix penicillata* com o protozoário, e, após 20 ou 30 dias, os flagelados foram encontrados no sangue periférico do macaco. Ao analisar o protozoário, notou que ele era semelhante às espécies de *Trypanosoma*. Chagas realizou estudos com outras espécies de animais e notou que o

protozoário era patogênico não só para o macaco, mas também para cobaias, coelhos, cães. Com essa informação, Chagas retornou ao local onde havia encontrado os primeiros exemplares dos hemípteros infectados e ao analisar o sangue dos moradores locais, encontrou os mesmos flagelado descobrindo que o protozoário também era patogênico ao humano (CHAGAS, 1909).

Desde então passaram-se mais de 110 anos do descobrimento da doença de Chagas, que continua no rol das doenças negligenciadas e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2020), atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo. As estatísticas estimam que menos de 10% das pessoas com esta enfermidade recebem o diagnóstico e menos de 1% recebem o tratamento adequado, sendo que 65 milhões de pessoas vivem sob o risco de adquirir a infecção. No Brasil, estima-se que a infecção atinge entre 1,9 milhões e 4,6 milhões de pessoas, uma vez que, dados sobre a doença de Chagas são bastante limitados (DIAS et al., 2016) e apenas neste ano (2020), a doença de Chagas crônica foi incluída na lista de doenças de notificação compulsória (Portaria 264, 17 de fevereiro de 2020), visto que, anteriormente apenas a doença aguda era de notificação obrigatória.

De acordo com o último Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2020), entre 2007 a 2019 foram confirmados 3.060 casos de doença de Chagas aguda, com média de 222 casos/ano, sendo que a via de transmissão com maior número de casos foi a via oral. Além disso, 53,56% dos infectados eram do sexo masculino e apresentavam média de idade de 32 anos ($\pm 20,15$) e menos de 2% dos casos eram em gestantes. Ainda de acordo com o Boletim Epidemiológico (2020) no período de 2007 a 2017, foram registradas 51.293 mortes pela doença de Chagas, ou seja, em torno de 4.663 óbitos por ano, superando a média anual de óbitos atribuídos à tuberculose (4.616) e às hepatites virais (2.815) no mesmo período.

Destaca-se, ainda, o impacto da doença de Chagas em relação aos anos de vida perdidos em decorrência das incapacidades atribuídas a doença - DALY (Anos de vidas perdidos ajustados por incapacidades, que é a soma do valor de dois indicadores: YLL- Anos de vida perdidos por morte prematura e YDL: Anos perdidos devida à incapacidade). Em estudo realizado entre 2000 a 2010 estimou-se um total de 7.402.559 DALY devido à cardiomiopatia chagásica, sendo 674.645 (9%) devido a YLL e 6.727.914 (91%) a YLD (Da NÓBREGA; ARAÚJO; VASCONCELOS, 2014). Além disso, a doença de Chagas tem elevado impacto econômico, em um estudo realizado na Colômbia (CASTILLO-RIQUELME et al., 2008), calculou-se o gasto médio estimado no tratamento de um paciente crônico ao longo da vida e estimou-se que o valor poderia chegar à U\$\$ 11.619, neste mesmo estudo calculou-se que o ônus econômico do cuidado médico para todos os pacientes com a doença crônica é em torno de U\$\$ 267 milhões/ano. No Brasil, a doença de Chagas têm impacto direto na Previdência

social e em serviços do INSS, sendo que entre 2007 e 2019 foram disponibilizados cerca de 13.500 benefícios de auxílio doença no Brasil, com média de 1.000 benefícios/ano (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Atualmente, devido a globalização, a doença de Chagas também passou a ser importante em outros países, visto que, indivíduos infectados se dispersaram para áreas não endêmicas como América do Norte e Europa. Acredita-se que cerca de 72 mil pessoas infectadas pelo *T. cruzi* vivam em países da Europa (ECDC, 2014). O evento da globalização propicia aumento no risco de transmissão transfusional em países não endêmicos, contudo alguns países têm adotado estratégias de triagem sorológica para reduzir estes riscos (SCHMUNIS, 1991; ANGHEBEN et al., 2015). Além disso, no Brasil, em decorrência da elevada taxa de migração, ocorrida nas últimas décadas, o número de casos em zonas urbanas é maior do que em zonas rurais (figura 4).

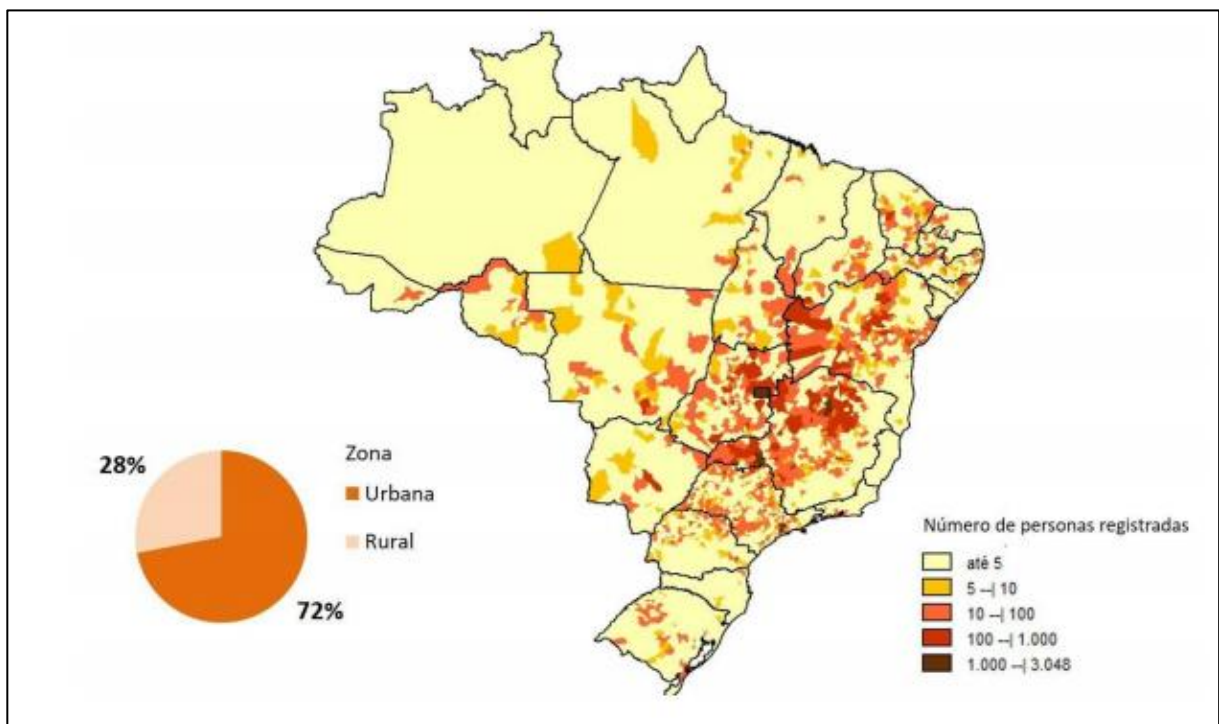


Figura 4: Distribuição dos casos autorreferidos para doença de Chagas, segundo município de residência, dezembro/2015, Brasil. Fonte: Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde, 2020.

2.3.2. Formas da doença de Chagas e diagnóstico:

2.3.2.1. Fase aguda:

De acordo com a classificação internacional de doenças e problemas relacionados à saúde (CID 10), a doença de Chagas aguda é definida como uma doença com sinais ou sintomas quase sempre inespecíficos, que pode evoluir para a fase crônica

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A fase aguda ocorre após alguns dias da infecção e o período de incubação pode variar de acordo com a forma de transmissão, sendo de 4 a 15 dias na forma vetorial e de 3 a 22 dias na transmissão por via oral, por exemplo. Os sinais clínicos e sintomas que o indivíduo infectado pode apresentar são febre persistente com duração de 30 a 45 dias associada a uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: edema de face ou de membros, exantema, artralgia, cefaleia, mialgia, adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiopatia aguda, icterícia, manifestações hemorrágicas, nos casos em que a transmissão é por via vetorial o indivíduo pode apresentar chagoma de inoculação e/ou sinal de Romanã (NEVES, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O chagoma de inoculação, caracteriza-se por apresentar lesões furunculóides, não supurativas, em membros, tronco e face, por reação inflamatória à penetração do parasito, que se mostram descamativas após 2 ou 3 semanas. Já o sinal de Romanã, que ocorre quando a picada do inseto vetor se dá próximo ao olho, caracteriza-se, essencialmente, por edema elástico bipalpebral, indolor, com reação de linfonodo satélite. Frequentemente o edema se propaga à hemiface correspondente; é de proporção variável, podendo ser tão acentuado a ponto de ocasionar oclusão total da fenda palpebral (DIAS et al., 2016).

A parasitemia torna-se patente entre o 4º e o 40º dia pós infecção e permanece por aproximadamente 30 dias. As alterações laboratoriais encontradas em pacientes com a doença de Chagas aguda incluem anemia, que pode ser grave, leucocitose por linfocitose, pode haver hipoproteinemia, com redução da albumina sérica e aumento das globulinas. Alterações nas enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) também podem ser encontradas (PINTO et al., 2008; REY, 2008) Nas formas agudas grave pode surgir quadro de miocardite com taquicardia ou alterações no ritmo cardíaco, abafamento de bulhas, aumento da área cardíaca, e sinais de insuficiência circulatória (edema, congestão hepática, dificuldade respiratória). Alterações cardíacas na fase aguda costumam ser reversíveis. Além disso, em crianças com menos de 5 anos a mortalidade é elevada. Outra forma grave da doença é a meningoencefalite, quase sempre observada em lactentes que dura poucos dias e normalmente culmina na morte do indivíduo, contudo, é rara (REY, 2008).

O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda pode ser realizado por diversos métodos, como a pesquisa das formas tripomastigotas de *T. cruzi* na avaliação citológica sanguínea direta ou por método de concentração, principalmente nas primeiras 6 semanas, nas quais as formas tripomastigotas estão presentes em grande número na circulação, o ideal é que o paciente esteja febril no momento da coleta (CHIARI; GALVÃO, 1997; REY, 2008). Exames sorológicos também podem ser realizados, as metodologias utilizadas são a hemoaglutinação

indireta, imunofluorescência indireta e método imunoenzimático (REY, 2008). A punção de linfonodos também pode ser realizada, visto que, os parasitos migram desde o início da infecção para os linfonodos, principalmente quando a infecção se dá por via vetorial, no qual há adenite dos linfonodos satélites. Contudo, deve-se ter cuidado ao realizar o diagnóstico da doença de Chagas através deste método, uma vez que, a forma amastigota do *T. cruzi* é muito semelhante a forma amastigota de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana*), neste caso as manifestações clínicas do paciente devem ser exploradas (REY, 2008).

O diagnóstico em recém-nascidos deve ser realizado através da pesquisa das formas tripomastigotas de *T. cruzi* na avaliação citológica sanguínea direta, visto que, até os 9 meses de idade a criança pode apresentar anticorpos IgG anti-*T. cruzi* maternos circulantes (CARLIER et al., 2011). O exame parasitológico do esfregaço sanguíneo deve ser realizado nos dez primeiros dias de vida. O tratamento deve ser iniciado imediatamente em caso de resultado positivo e, em caso de resultado negativo com sintomatologia clínica compatível com a doença de Chagas. Nos casos em que os recém-nascidos apresentem exame parasitológico negativo e não apresentem sintomatologia, os mesmos devem ser submetidos, após os 9 meses de idade, a dois testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

2.3.2.2. Fase crônica:

A fase crônica da doença de Chagas pode variar desde ausência de sinais clínicos (forma indeterminada) a doença grave com comprometimento cardíaco, digestivo (megaesôfago, megacólon, megaesôfago) ou cardiodigestivo (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Em alguns casos a fase crônica se instala logo após o período agudo, em outros casos, a fase crônica, se desenvolve após um período assintomático que pode durar anos. Ainda, a fase crônica pode se instalar sem que tenha havido sintomatologia aguda. Os casos assintomáticos, com sorologia positiva, mas sem alterações cardíacas e intestinais são denominados como forma indeterminada, visto que, apresentam prognóstico incerto, podendo evoluir para formas crônicas típicas ou permanecer com ausência de sinais e sintomas (REY, 2008).

A forma gastrointestinal se manifesta por disfunção gastrointestinal (principalmente mega esôfago, megacólon, ou ambos) e se desenvolve em cerca de 10 a 15% dos pacientes cronicamente infectados. O megaesôfago causa disfagia, dor epigástrica, regurgitação, ptialismo e desnutrição, nos casos graves. A presença do megaesôfago em pacientes chagásicos aumenta a predisposição ao desenvolvimento de câncer de esôfago. O megacólon geralmente afeta o segmento sigmóide, reto e/ou cólon descendente e produz longa constipação, distensão

abdominal, e em alguns casos formação de fecaloma com obstrução do intestino grosso (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A forma cardíaca desenvolve-se em 20 a 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e é a forma mais grave da doença de Chagas crônica. Leva a anormalidades que variam desde uma leve arritmia até insuficiência cardíaca congestiva. Alguns pacientes apresentam apenas palpitações e astenia, com alterações no eletrocardiograma e área cardíaca normal ou ligeiramente aumentada. Outros pacientes apresentam nítido aumento da circunferência cardíaca. Em casos mais graves a insuficiência cardíaca é acompanhada de outros sintomas encontrados em cardiopatias de etiologias diversas, como edema, derrames cavitários, dispneia, congestão visceral, aneurismas apicais, tromboembolismo e morte súbita (REY, 2008).

As anormalidades mais comuns no ECG são bloqueio do ramo direito, bloqueio fascicular anterior esquerdo, batimentos prematuros ventriculares, alterações de ST-T, ondas Q anormais e baixa voltagem do QRS. A combinação de bloqueio de ramo direito e bloqueio fascicular anterior esquerdo é muito típica na cardiopatia da doença de Chagas (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Contudo, o acompanhamento das alterações em relação a circunferência cardíaca através do raio x é um método mais seguro para prognosticar a doença do que o acompanhamento do eletrocardiograma (REY, 2008).

O diagnóstico, na fase crônica, pode ser realizado através de exames sorológicos, sendo que, os testes utilizados são o de hemoaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e o método imunoenzimático. Considera-se indivíduo infectado na fase crônica aquele que apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, detectados por meio de dois testes sorológicos de princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas, visto que, há possibilidade de falso-positivo e falso-negativo. Os níveis de anticorpos da classe IgG começam a subir a partir da segunda semana pós infecção, alcançando níveis máximos ao redor do 50º dia pós infecção, permanecendo assim por toda a vida em indivíduos não tratados/curados na fase aguda (figura 5). O padrão da curva de parasitemia na fase crônica pode modificar-se nos casos em que ocorre reativação da parasitemia por imunodepressão (como em pacientes chagásicos crônicos co-infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida) onde há elevação da parasitemia (DIAS et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017).

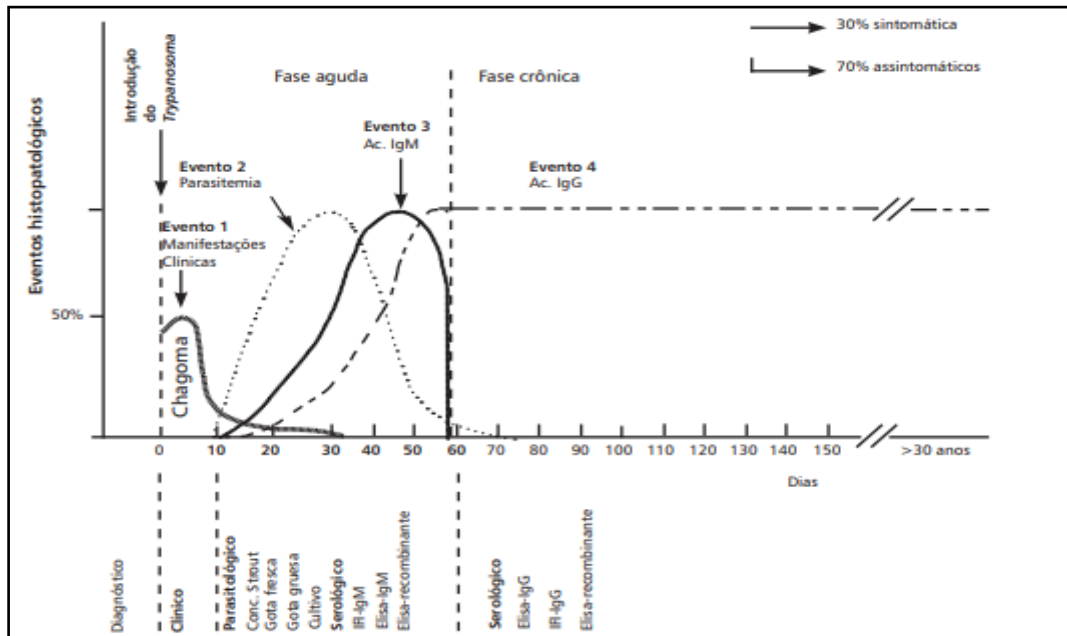


Figura 5: Eventos fisiopatológicos da doença de Chagas. Fonte: MINISTERIO DA SAÚDE, 2019.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) têm se mostrado um método promissor no diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica pois permite o diagnóstico exato da doença e, pode ser utilizada para monitorar a eficácia dos esquemas terapêuticos adotados no tratamento dos pacientes (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003). Contudo, este método de diagnóstico ainda apresenta algumas limitações, uma vez que, não existem protocolos definidos e procedimentos operacionais padronizados, além de apresentar elevado custo sendo utilizado apenas em ambientes de pesquisa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; ALVES et al., 2018; VERGARA et al., 2019).

2.3.3. Tratamento

Logo após a descoberta da doença de Chagas diversos compostos foram desenvolvidos com o intuito de tratar a infecção, dentre eles o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio. Contudo, nenhum destes compostos apresentou atividade frente ao *T. cruzi* (CROFT, 1999; COURA; CASTRO, 2002). Em 1967, a classe dos nitrofuranos foi introduzida na terapêutica da doença, sendo o Nifurtimox (Nif), 3-metil-4(5-nitrofurfurilideno-amino)-tetra-hidro-4H-(1,4)-tiazina-1-1-dióxido (figura 6a) (LAMPIT® /BAYER – BOCK et al., 1969), o medicamento que mais se destacou. Em 1972, um derivado nitroimidazólico, Benznidazol (Bz) 2-Nitro-N-(fenilmetil)-1-imidazol-1-acetamida (figura 6b) (ROCHAGAN® /ROCHE – GRUNBERG et al., 1967), também foi introduzido na terapêutica de pacientes chagásicos.

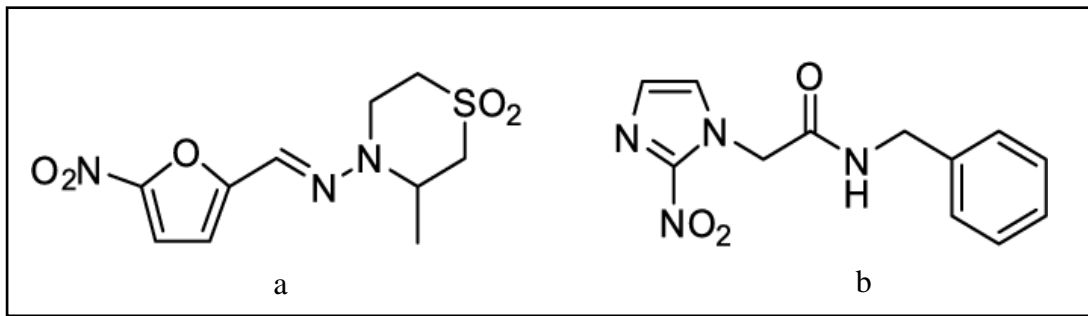


Figura 6: Estruturas moleculares dos fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas. (a) Molécula de Nifurtimox; (b) Molécula de Benznidazol. Fonte: SILVA JR, et al., 2014.

O objetivo do tratamento na doença de Chagas é eliminar o parasito e tratar os sinais clínicos induzidos pelas alterações provocadas pelo mesmo. Atualmente, mais de cinco décadas após a descoberta do Nfx e do Bz, estes dois medicamentos ainda são os únicos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas e desde a década de 1980, o Nfx teve a sua comercialização interrompida no Brasil e, em seguida em outros países da América do Sul, como a Argentina, o Chile e o Uruguai, devido à resistência apresentada por algumas cepas de *T. cruzi* ao fármaco, além da alta toxicidade (COURA; CASTRO, 2002; KOROLKOVAS, 2003). Outro fator que levou a interrupção da produção do Nfx foi o desinteresse do laboratório farmacêutico Bayer, em continuar a produção, uma vez que, o Nfx não apresentava grandes lucros (COURA; CASTRO, 2002).

Ambos os medicamentos possuem eficácia, com níveis de cura ao redor 80%, na fase aguda da doença (CANÇADO, 1999; COURA; CASTRO, 2002; RASSI JR, RASSI; MARINETTO, 2010). No entanto, quando ocorre evolução para a fase crônica a eficácia dos medicamentos pode variar de 8 a 30% (OLIVEIRA et al., 2008). O nifurtimox também apresenta atividade tripanocida frente a outras espécies de *Trypanosoma*, como o *T. brucei*, responsável pela doença do sono, que atinge populações da África equatorial, e pode apresentar potencial de cura nos estágios precoce e tardio desta doença (ALEXANDRE et al., 2014).

Embora o Nfx e o Bz estejam em uso clínico há mais de cinquenta anos, estes dois compostos são considerados promedicamentos, que requerem ativação através de enzimas nitroredutases (PETERSON et al., 1979; WILKINSON et al., 2008). O grupamento nitro do Nfx e do Bz é reduzido pela ação das nitroredutases, o que induz a formação de radicais livres e metabólitos nucleofílicos. Este processo inicia com a reação catalisada pelo NADPH-citocromo P-450 redutase, que atua sobre o grupamento nitro das moléculas, levando à produção de um radical ânion nitro intermediário. Para Nfx o radical tem elevado potencial redox, sofrendo reação do tipo redox com o oxigênio, o qual reduz e regenera parcialmente o

fármaco (DIAZ et al., 1988). Ao mesmo tempo, o oxigênio é reduzido a ânion superóxido. A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre por dismutação do ânion superóxido. O ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, na presença do íon férrico, formam o radical livre hidroxila (reação Haber–Weiss). Os radicais livres produzidos, ligam-se a lipídios, proteínas e DNA induzindo a atividade tripanocida (URBINA, 1999; MAYA et al., 2006). Por outro lado, o mecanismo de ação do Bz não está completamente elucidado, contudo, há evidências que indicam que o Bz não envolve danos oxidativos e, pode agir por estresse redutivo, através de radicais livres nitrogenados produzidos pelas nitroreductases que envolvem a modificação covalente das macromoléculas ou por outras interações de nitro redução com os componentes do parasito (URBINA, 2002; DOCAMPO; MORENO, 1984).

Os efeitos adversos decorrentes do uso de ambos os fármacos ocorre devido à baixa seletividade que estes medicamentos possuem, uma vez que, agem tanto nas macromoléculas, lipídeos, proteínas e DNA do parasito quanto do hospedeiro (URBINA et al., 1999; DIAS et al., 2009). Sérios efeitos adversos têm sido relatados no uso do Bz e, incluem alterações dermatológicas (figura 6), como dermatopatia alérgica e esfoliativa, eritema, erupções cutâneas, prurido, urticária e erupções bolhosas; alterações gastrointestinais como náuseas, vômito, dor abdominal e epigástrica; alterações no sistema nervoso como vertigem, hipoestesia, parestesia e polineurite; alterações musculares como artralgia e astenia, alterações cardiovasculares como edema periférico (figura 7), além de cefaleia e febre (De PONTES, et al., 2010; MOLINA et al., 2014). A depressão da medula óssea já foi relatada em pacientes em tratamento com o Bz, contudo este efeito adverso é raro e, as alterações encontradas são neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica, dessa forma, é recomendado a realização do hemograma antes do início do tratamento e no 10°, 20°, 37° e 52° dias após o início da terapia (CANÇADO, 2002). Os efeitos adversos do Bz tendem a desaparecer quando a dose é reduzida ou ocorre a interrupção do tratamento e, por este motivo o índice de abandono da terapia é elevado (CANÇADO et al., 2000; De PONTES et al., 2010).



Figura 7: Reações adversas induzidas pelo tratamento com Benznidazol. (a) Placas eritematosas; (b) dermatite esfoliativa, (c) erupção cutânea; (d) edema das extremidades. Fonte: De PONTES et al., 2010.

Os efeitos colaterais do Nfx incluem anorexia, perda de peso, náuseas, vômitos, cólicas intestinais, diarreia, alterações psíquicas, excitabilidade, irritabilidade, sonolência, insônia, polineurite, dermatopatias alérgicas, tremores, astenia e vertigem (PRATA et al., 1975; CANÇADO, 2002; CASTRO et al., 2006). Em estudo realizado por Coura e colaboradores (1997), comparando os efeitos adversos decorrentes do uso do Nfx e do Bz, observou-se que o tratamento com Nfx, mesmo em doses inferiores (5 mg/kg) a dose recomendada (8 a 10 mg/kg), induziu efeitos colaterais mais intensos do que o uso do Bz, além disso, o índice de abandono do tratamento também foi superior, 29,6%, enquanto que o índice de abandono da terapia em pacientes tratados com o Bz foi de 11,5%. Em crianças os efeitos adversos de ambos os fármacos costumam ser bem tolerados (CANÇADO, 2002).

Embora o Bz e o Nfx apresentem níveis elevados de sucesso na terapêutica da doença de Chagas na fase aguda (CANÇADO, 1999; COURA; CASTRO, 2002; RASSI JR, RASSI; MARIN-NETO, 2010). Ambos os medicamentos não são considerados ideais, visto que, não apresentam níveis elevados de cura na fase crônica (OLIVEIRA et al., 2008), além de apresentar inúmeros efeitos colaterais (URBINA et al., 1999; DIAS et al., 2009; De PONTES et al., 2010), mesmo nas doses usuais (COURA et al., 1997), o que induz muitos pacientes a abandonar a terapia. Dessa forma, a busca por fármacos que sejam capazes de combater a doença de Chagas tanto na fase aguda, quanto na fase crônica e que não apresentem efeitos colaterais tão deletérios, é necessária, sendo assim, diversos grupos de estudo têm buscado uma alternativa ao tratamento para esta doença (CERECETTO et al., 1999; BOIANI et al., 2008)

2.3.4. Derivados benzofuroxanos

Os derivados benzofuroxanos (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol) (figura 8) são compostos orgânicos, heterocíclicos que contém um grupamento *N*-óxido e um anel benzofuroxânico (GOSH et al., 1981). Os heterociclos são utilizados como blocos construtores para a síntese de novas substâncias e, representam uma importante classe de compostos, pois possuem diversas atividades biológicas relevantes (BARREIRO, 1991; MELO, et al., 2006; DEWANGAN, et al., 2010).

A enorme gama de atividades farmacológicas dos derivados benzofuroxanos é conhecida há décadas (SCHIEFER et al., 2012). Dentre as atividades biológicas já descritas para estes derivados destacam-se as propriedades antifúngicas, antitumorais e antiparasitárias (CASTRO et al., 2009; CHUGUNOVA et al., 2015; DUTRA et al., 2014).

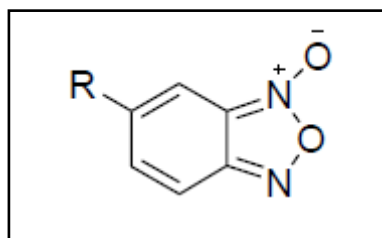


Figura 8: Estrutura química dos derivados benzofuroxanos (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol). Fonte: DIAS et al., 2009.

Em estudo realizado por Cerecetto e colaboradores (1999), os derivados benzofuroxanos desenvolvidos mostraram atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas epimastigotas do *T. cruzi* e, os resultados obtidos neste estudo foram comparados aos resultados produzidos pelo

Nfx. Além disso, Boiani e colaboradores (2006), em outro estudo, avaliando a atividade dos benzofuroxanos derivados comparam sua atividade tripanocida ao Bz. Além destes estudos, muitos outros têm sido realizados a fim de desenvolver uma molécula que seja capaz de combater o *T. cruzi*. Estes experimentos são realizados modificando a cadeia lateral do núcleo furoxânico e grupamentos ligados ao anel benzofuroxânico (AGUIRRE et al., 2005; CERECETTO et al., 2005; OLEA-AZAR et al., 2003; BOIANI et al., 2008; CASTRO et al., 2009).

A atividade dos benzofuroxanos derivados está ligada a presença da porção *N*-óxido, uma vez que, quando esta porção é removida da molécula há perda da atividade tripanocida (BOIANI et al., 2008; HERNANDEZ et al., 2013). A porção *N*-óxido atua como um grupamento biorredutível e está ligada a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs), sendo que, o óxido nítrico (ON) é a principal espécie reativa gerada (JOVENÉ et al., 2013). Tem sido proposto que a citotoxicidade dos benzofuroxanos derivados decorra da reação com o grupo tiol e, que por este motivo apresentem potencial atividade inibidora de tripanotona redutase (JORGE et al., 2013). Além disso, o ataque de uma molécula de tiol ao nitrogênio do grupamento *N*-óxido faz com que o átomo de enxofre da cisteína aja como nucleófilo, levando a abertura do anel benzofuroxânico e produzindo um intermediário. Uma segunda molécula de tiol ataca o carbono alfa da sub-unidade *N*-óxido substituído e ocorre a formação de subprodutos e tionitrito, precursor de ON (BOSQUESI, 2013; JOVENÉ et al., 2013). Os compostos derivados benzofuroxânicos são metabolizados predominantemente no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (CHEN, 2008).

O ON é uma molécula que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos. Está presente no sistema cardiovascular, no qual participa de processos na homeostase vascular, como no relaxamento dos vasos sanguíneos e inibição da agregação plaquetária, a deficiência desta molécula é associada a trombose vascular. O ON também está presente no sistema nervoso central, no qual participa dos processos de aprendizado e da memória e pode mediar respostas excitatórias a certos aminoácidos. No sistema respiratório, os nervos da musculatura lisa bronquiolar liberam ON como mediador do controle da broncodilatação. No sistema digestivo, o ON é responsável por mediar o relaxamento não colinérgico e não adrenérgico da musculatura do esfíncter esofágico, do estômago, duodeno, intestino delgado e esfíncter anal. O ON também atua no sistema reprodutor, controlando a musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e vasos sanguíneos aferentes (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). No sistema imunológico, o ON, atua como um importante mediador, participando da estimulação imunológica, visto que, é capaz de destruir uma diversidade de microorganismos e, também,

células tumorais (JENKINS et al., 1995; MURTA et al., 2002 CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

O ON tem sido descrito como crucial no controle da carga parasitária em animais infectados pelo *T. cruzi* visto que, é capaz de mediar a morte intracelular do parasito (GUTIERREZ et al., 2009; SANMARCO et al., 2016). Sabe-se, também, que o ON é capaz de interromper o ciclo de vida do *T. cruzi* através da inativação de enzimas importantes, como por exemplo a enzima cruzipaina, que apresenta papel crucial na invasão celular e nutrição do *Trypanosoma*, evidências indicam que esta enzima é extremamente necessária para a sobrevivência intracelular do parasito, uma vez que, participa de diversos processos biológicos do protozoário (VENTURINI et al., 2000). Apesar do grande número de atividades benéficas que o ON desempenha, esta molécula pode apresentar atividade pró-inflamatória quando sua produção ocorre de maneira descontrolada. De acordo com Ribeiro e colaboradores (2007), quantidades elevadas de ON na infecção experimental pelo *T. cruzi* provocaram dano ao DNA de células cardíacas e esplênicas em hospedeiro infectado levando a morte celular das mesmas. Além disso, Martins e colaboradores relacionaram os altos níveis de ON ao pico da parasitemia pelo *T. cruzi*. Dessa forma, é indispensável que haja um equilíbrio na produção desta molécula para que a ação tripanocida seja alcançada.

Em adição à atividade tripanocida exercida pela liberação de ON pelos derivados benzofuroxanos, a capacidade de produzir outras espécies reativas leva a desestabilização da membrana celular do *T. cruzi*, visto que, este protozoário é sensível a ação dos radicais livres, pois é deficiente em mecanismos de defesa, sendo mais sensível ao estresse oxidativo do que as células do hospedeiro humano (BERNARDES et al., 2006; DIAS et al., 2009). Além disso, alguns autores relatam que a porção *N*-óxido do heterociclo também é capaz de interferir na cadeia respiratória mitocondrial do parasito, gerando danos ao protozoário através da inibição da respiração mitocondrial (CASTRO et al., 2009).

Dessa forma, os derivados benzofuroxanos podem ser explorados do ponto de vista farmacêutico e medicinal no combate ao *T. cruzi*, visto que, possuem atividades benéficas no controle da infecção, uma vez que, a atividade tripanocida *in vitro* destes derivados já foi descrita (CERECETTO et al., 1999; BOIANI et al., 2006). Sendo assim, o objetivo desta tese foi avaliar um derivado benzofuroxano frente ao *T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, além de verificar a atividade citotóxica e genotóxica *in vitro* deste derivado frente a leucócitos humanos e pesquisar em animais saudáveis e infectados pelo *T. cruzi*, possíveis danos hematológicos, hepáticos e renais provocados pelo tratamento com o composto teste em três diferentes concentrações.

3. ARTIGOS

3.1 ARTIGO I

O artigo I, intitulado “CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF A BENZOFUROXAN DERIVATIVE, *IN VITRO*”, relata a síntese e avaliação *in vitro* da citotoxicidade e da genotoxicidade de um composto benzofuroxano derivado.

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF A BENZOFUROXAN DERIVATIVE, *IN VITRO*

Letícia dos Santos Petry^{a,*}, João Cândido Pilar Mayer^b, Luís Flávio Souza de Oliveira^c,
Michel Mansur Machado^c, Luciano Dornelles^b, Sílvia Gonzalez Monteiro^a

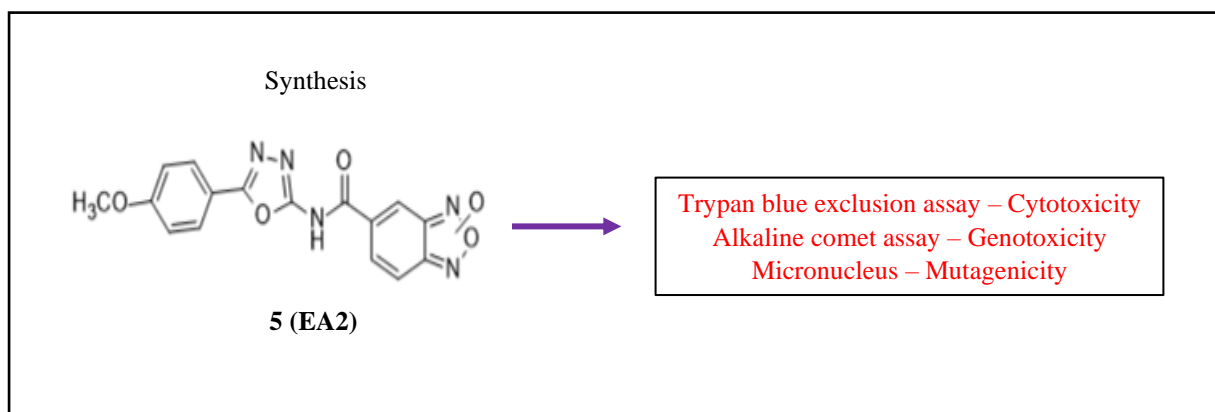
^aDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartamento de Química, LabSelen-NanoBio, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^cNúcleo de Pesquisa em Bioquímica, Toxicologia e Imunologia, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

*author corresponding: leticiaspetry@gmail.com

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Benzofuroxan derivatives have been the object of several studies, owing to their ability to generate reactive oxygen/nitrogen species, especially nitric oxide, which is a molecule associated with physiological and pathological processes and is described as an important cytotoxic mediator that can act on several microorganisms and tumor cells. Thus, the objective of this study was to synthesize a benzofuroxan derivative and perform an *in vitro* evaluation of its cytotoxic and genotoxic effects. EA2, the compound used in this study, was synthesized by coupling an amine to a carboxylic acid. The trypan blue exclusion assay was performed to evaluate cytotoxicity, the alkaline comet assay was used to determine genotoxicity, and the micronucleus test was used to evaluate mutagenicity. EA2 was successfully synthesized with a yield of 46% and characterized by ¹H and ¹³C NMR. For the experiments, EA2 was diluted to three different concentrations: 10 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, and 100 μg mL⁻¹. At the doses evaluated, EA2 did not exhibit mutagenic activity. However, cytotoxic and genotoxic effects

were not observed at only the lowest dose. Thus, it was possible to synthesize EA2 and to obtain a moderate yield. Moreover, the compound was safe when used *in vitro* at a dose of 10 µg mL⁻¹. Nevertheless, further studies are required to ensure the therapeutic safety of EA2.

Keywords: Synthesize; Benzofuroxan derivative; EA2; Cytotoxic; Genotoxic.

1. INTRODUCTION

Compounds derived from benzofuroxan (*N*-oxide-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole) exhibit several biological characteristics including antifungal, antitumor, and antiparasitic properties.¹⁻³ In general, the biological properties of benzofuroxan derivatives result from their ability to release nitric oxide (NO) and generate reactive oxygen species (ROS).⁴ NO is an important messenger that participates in various physiological and pathological processes. It plays an important role in immune stimulation and is able to destroy a wide range of microorganisms and tumor cells. In addition, NO participates in processes related to vascular homeostasis such as vasodilation and inhibition of platelet aggregation.

In the presence of cysteine amino acid derivatives containing free thiol groups, the benzofuroxan nucleus of certain derivatives oxidizes the sulfur atom, leading to the generation of disulfides. The subsequent enzyme inactivation^{5,6} results in increased ROS production.⁷

Several studies evaluated the activity of benzofuroxan derivatives against protozoa such as *Trypanosoma cruzi*, specifically because these molecules can release NO and generate ROS, thereby exacerbating destabilization of the cell membrane via increasing the production of free radicals, exerting oxidative stress, and ultimately damaging the protozoa.⁸ Many studies have also related the activity of benzofuroxan derivatives to their ability to damage the parasite's mitochondrial respiratory chain, thus inhibiting its respiration.^{1,9,10}

In addition, benzofuroxan derivatives exhibit similar *in vitro* activity to the reference drug, benznidazole.¹¹ Thus, many study groups have developed benzofuroxan derivatives, modifying the lateral chain of the furoxan nucleus and attaching clusters to the benzofuroxan ring. Hence, the objective of this study was to synthesize and evaluate the *in vitro* cytotoxic and genotoxic effects of a benzofuroxan derivative, which has been the object of studies on *T. cruzi* performed by the authors' research group, as *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity assays are the first line of studies in the evaluation of new drugs. The objective of this study was to predict the potential cytotoxic and/or genotoxic activity and develop chemical structures with lower toxicity.¹²⁻¹⁴

2. EXPERIMENTAL

2.1. Synthesis of the benzofuroxan derivative

The benzofuroxan derivative evaluated in this study was synthesized in the LabSelen NanoBIO of the Federal University of Santa Maria. This compound was referred to as “EA2” and has the IUPAC name of “5-((5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbamoyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-N-oxide”. To the best of our knowledge, this is the first study on this molecule.

EA2 (**5**) was obtained by coupling 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine **2** to benzofuroxan-carboxylic acid **4**, a reaction mediated by the coupling agent *N*-(3-(dimethylamino)prop-1-yl)-*N*'-ethyl-carbodiimide (EDC)¹⁵ using an adapted procedure conducted with a mixture of acetonitrile and dichloromethane, owing to the solubility of the starting materials. Amino-1,3,4-oxadiazole **2**¹⁶ and benzofuroxan-carboxylic acid **4**¹⁷ were prepared in accordance with established procedures.

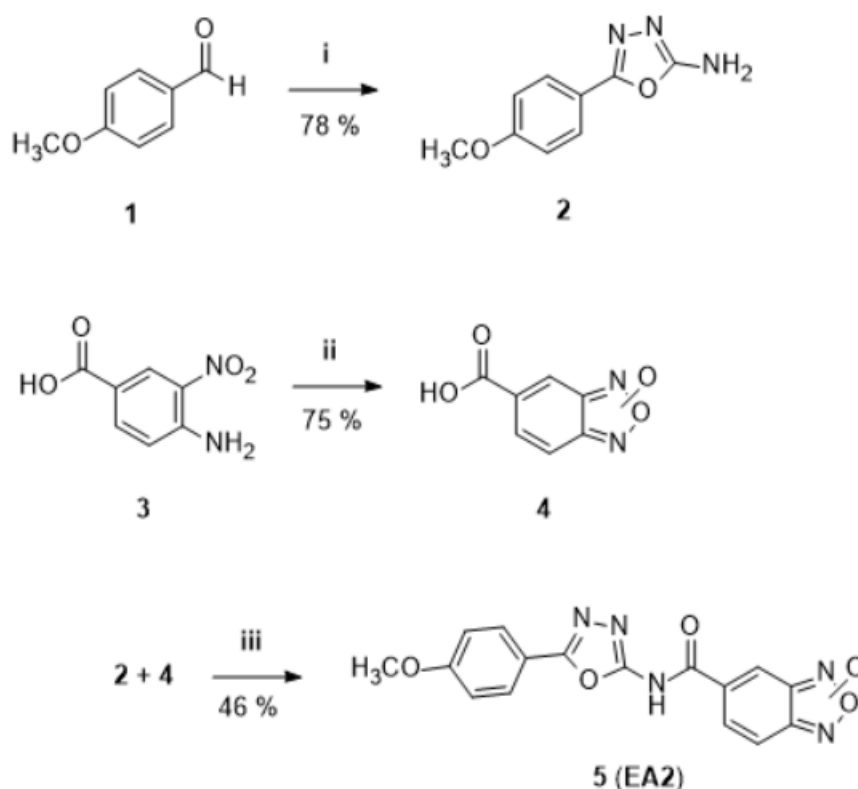


Fig. 1: Synthesis of EA2

i) a) $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2 \cdot \text{HCl}$, NaOAc, MeOH, H_2O , rt, 5 min; b) I_2 , K_2CO_3 , dioxane, reflux, 15 h. ii) a) KOH, EtOH, 70°C , 10 min; b) $\text{NaClO}_{(\text{aq})}$, 0°C , 1 h; c) Aq. 6 N HCl, rt. iii) EDC, CH_2Cl_2 , MeCN, rt, 1 h.

Benzofuroxan-carboxylic acid **4** (0.5 mmol) *N*-(3-(dimethylamino)prop-1-yl)-*N*'-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC) (0.6 mmol) were added to a round-bottomed flask equipped

with magnetic stirring containing an amine suspension **2** (0.5 mmol) in dichloromethane (5 mL) and acetonitrile (5 mL). The mixture was stirred for 1 h. After the consumption of the starting materials, as verified by CCD, the solvent was removed under reduced pressure. The raw product was ground in water, subjected to vacuum filtration, and dried under reduced pressure to obtain the pure EA2 compound (**5**). The product **5** (EA2) was characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

2.2. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effect of the EA2 compound:

Leukocyte cultures were prepared by seeding 0.5 mL of leukocytes (10^6 leukocytes per mL), which were previously separated by centrifugation of three self-certified healthy donors (CEP UNIPAMPA 27045614.0.0000.5323). Leukocytes were then transferred to culture medium containing 10 mL of RPMI 1640, an supplemented with 10% bovine fetal serum, streptomycin/penicillin, and 1% phytohemagglutinin, as described by Güez et al. (2017).¹⁸ Cell culture flasks were incubated at 37°C for 72 h with 5% CO_2 .

EA2 was then added to the leukocyte cultures at three different concentrations: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. RPMI 1640 was used as the negative control and 10 μM colcemid was used as the positive control.

Cytotoxicity was analyzed using the trypan blue exclusion assay, which measures cell viability by assessing membrane integrity; viable cells are impermeable to the dye and remain intact, whereas non-viable cells absorb the dye, which enters through pores formed in the outer cell membrane and stains the dead cells blue. The technique is performed by homogenizing 100 μL of cultured leukocytes with 100 μL of 0.2% trypan blue and incubating the homogenate for 3 minutes; then, the homogenate aliquot is placed in the Neubauer chamber. One hundred cells were counted and evaluated at 400 \times magnification by using an optical microscope.^{19,20}

The alkaline comet assay was used to evaluate the genotoxicity of the test compound. This assay followed the methodology described by Singh et al. (1988),²¹ which essentially consisted of homogenizing an aliquot of cultured leukocytes with low melting point agarose (0.75%); the homogenate was then used to prepare microscope slides that had been previously coated with 3% agarose. Subsequently, the slides were immersed in lysis solution for electrophoresis (20 min, 300 mA, 25 V). After electrophoresis, the slides were neutralized and dried at room temperature. Subsequently, the slides were rehydrated, fixed, dried again, and stained with 0.1% silver nitrate. DNA damage was scored in accordance with the damage index, in which one hundred nucleoids in each slide were evaluated and classified by tail length. Scores

ranged from 0 (zero; no damage) to 4 (four; maximum damage). DNA damage is calculated from cells with different damage scores, and varied from 0 (100×0 ; 100 cells with no damage) to 400 (100×4 ; 100 cells with maximum damage).

Mutagenicity was evaluated by using the micronucleus test described in the literature. The technique was based on the quantification of unrepaired double breaks in the DNA of cultured cells that are exposed to different concentrations of test compounds or aggressive agents.^{22,23} The slides were subjected to panoptic staining and then analyzed at 1000 \times magnification by using an optical microscope. In each slide, 500 (five hundred) cells were evaluated and classified as mononuclear with micronucleus, binuclear, or binuclear with micronucleus, or undergoing necrosis or apoptosis.

One-way ANOVA followed by the Tukey's post-hoc test was used for statistical analyses by using the specific statistical software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The increased number of studies involving benzofuroxan derivatives is due to the ability of these compounds to generate ROS and release NO.⁴ NO is known to play a beneficial role in the treatment of many diseases.^{2,3} However, exacerbation of ROS and NO production causes an imbalance between oxidants and antioxidants, which leads to the development of oxidative stress. Thus, ROS and NO may damage cellular structures such as nucleic acids, proteins, and lipids, and then induce cytotoxicity and genotoxicity.^{24,25}

Hence, a trypan blue exclusion assay was used to evaluate if the compound affected cell viability. This method is used to evaluate cell membrane integrity, considering the ability of the stain to permeate the cells.²⁶ The alkaline comet assay was used to analyze the presence of DNA damage, since this test is very sensitive and can provide information about cytogenetic damage induced by genotoxic molecules even when used at low concentrations.²⁷ The micronucleus frequency test, first described by Schmid in 1974, evaluates the formation of micronuclei, which is an important biomarker to confirm the cytogenetic damage of cells exposed to various agents. It indicates the mutagenic activity of the test compound.^{28,29} These techniques are internationally accepted as part of preclinical assays and are recommended by international regulatory bodies.³⁰ The *in vitro* assays performed in this study showed that it was possible to select an EA2 concentration that did not affect cell viability, cause DNA damage, or present mutagenic activity.

The results obtained from the trypan blue exclusion assay (Fig. 1) showed that, in comparison to the negative control, only the lowest EA2 concentration ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) resulted in no significant changes in cell viability. The other concentrations resulted in cytotoxic effects similar to those of the positive control.

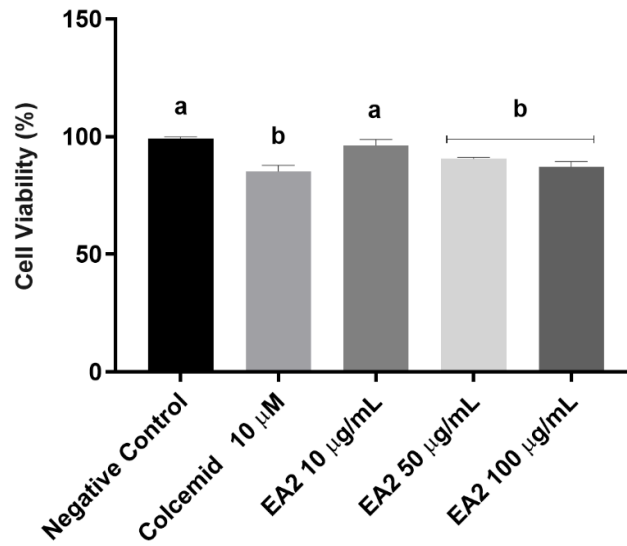


Fig. 1. Cell viability was measured after leukocytes were exposed to different EA2 concentrations. The data are presented as the mean \pm standard deviation. Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for statistical analysis. Colcemid = positive control.

Genotoxicity was assessed by the DNA damage index (Fig. 2). The alkaline comet assay showed that the lowest EA2 concentration produced no significant changes. Conversely, EA2 at concentrations of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ induced significant DNA damage in leukocytes compared with the negative control ($p < 0.05$). The damage was five times greater, and no difference was observed between the higher concentrations.

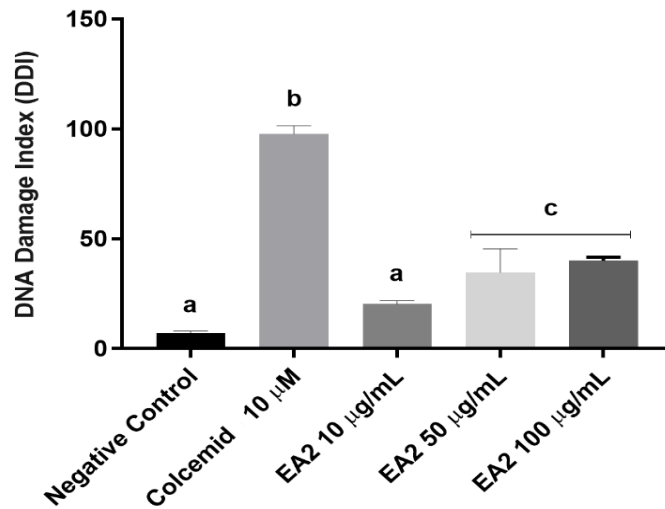


Fig. 2. DNA damage index. The data are presented as the mean \pm standard deviation. Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for statistical analysis. Colcemid = positive control.

The cytotoxic and genotoxic effects induced by higher EA2 concentrations ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) are probably associated with their ability to generate ROS and release NO. The deleterious action of ROS is due to its high reactivity, which leads to the oxidation of multiple cellular targets and, mainly, the induction of lipid peroxidation, which then changes the permeability and structure of plasma membranes.^{31,32} Excess ROS is one of the main causes of DNA damage.³³ The ability of ROS to modify DNA bases³⁴ results in interlinking DNA strands³⁵ and causes chromosomal abnormalities³⁶. In a study conducted by Baldissera et al. (2016)³⁷ increased ROS production in animals exposed to diminazene aceturate was linked to DNA damage.

NO is a small molecule that can modulate inflammatory or anti-inflammatory reactions, depending on the cell type and stimulus. However, when there is no control over the synthesis of NO, this molecule can participate in several pathological processes that trigger cell death and tissue damage³⁸⁻⁴⁰. Such events can occur directly, via the reaction of NO with metals present in enzyme structures of target cells (mainly iron). This leads to the inactivation of enzymes essential for the Krebs cycle, DNA synthesis, and cell proliferation.^{38,41} However, NO can also react with ROS and generate reactive nitrogen species such as peroxynitrite. Indirectly, this mechanism is used to disrupt cell signaling pathways and induces apoptosis by impairing the activity of certain transcription factors.⁴²⁻⁴³

Mutagenicity was evaluated using the micronucleus frequency test (Fig. 3). The results obtained showed no significant changes at the three concentrations evaluated ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$, 50

$\mu\text{g mL}^{-1}$, and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) compared with the negative control. This indicated that EA2 did not induce mutagenic damage at these concentrations, which is of great importance as a high frequency of micronuclei may be related to the risk of developing cancer or genetic diseases⁴⁴. Thus, the *in vitro* assays demonstrated that EA2 is a safe compound from a mutagenic perspective.

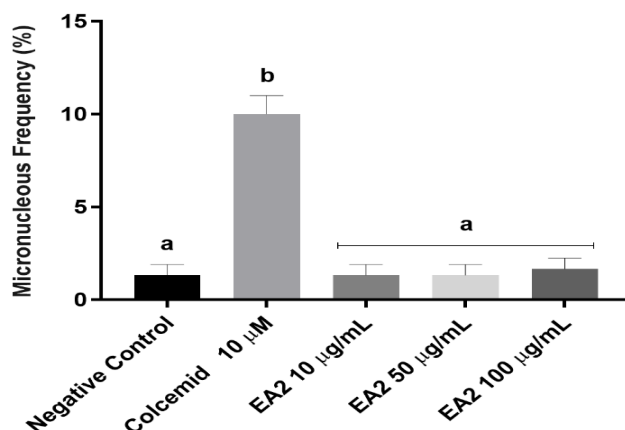


Fig. 3. Micronucleus frequency test. The data are presented as the mean \pm standard deviation. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for statistical analysis. Colcemid = positive control.

For the synthesized EA2, the following results were obtained: Yield = 46% (yellow solid). $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ (ppm): 8.48 (sl, 1 H); 8.35 (sl, 1 H); 7.87 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz); 7.71 (sl, 1 H); 7.01 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz); 3.90 (s, 3 H). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 163.5; 154.6; 151.2; 128.9; 127.6; 114.7; 114.0; 55.6. Carbons corresponding to the benzofuroxan system showed no visible signs in the NMR spectrum, owing to the rapid tautomerization of the furoxan ring.⁴⁵

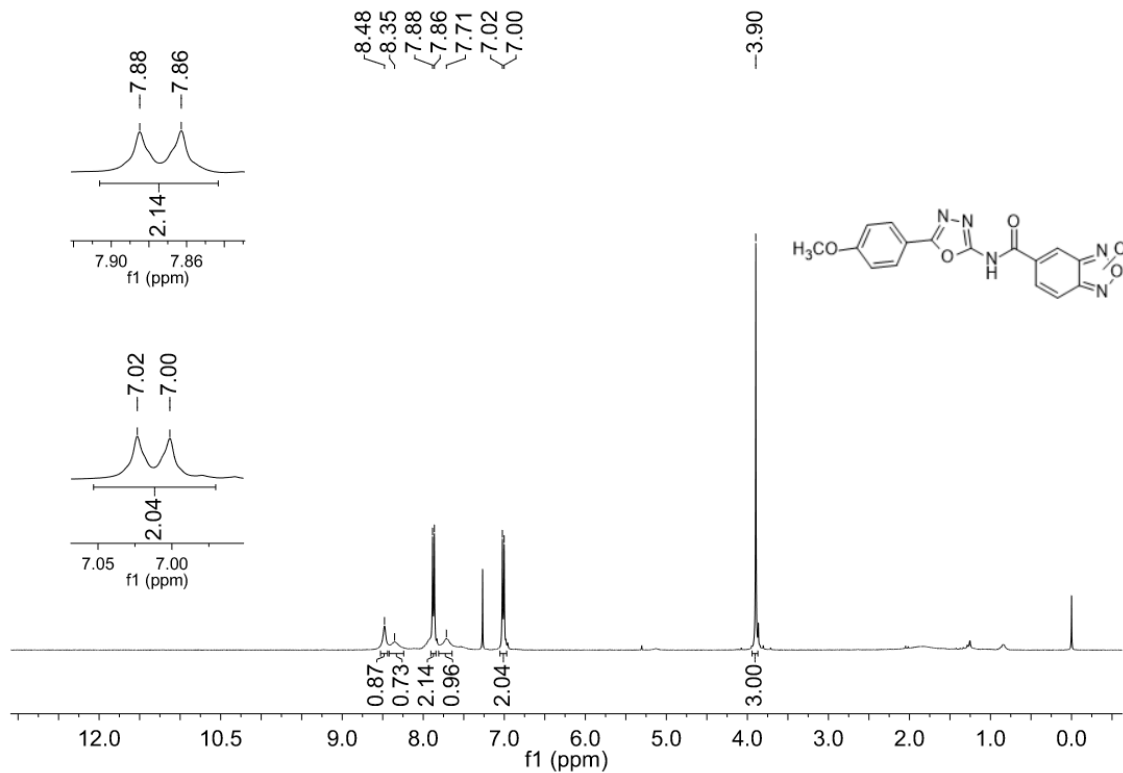
4. CONCLUSION

EA2 (5-((5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbamoyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-*N*-oxide) was successfully synthesized and characterized by ^1H and ^{13}C NMR. In addition, in the present study, no concentrations tested ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) caused mutagenicity. However, only the lowest EA2 concentration ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) was safe and did not affect cell viability or induce mutations in DNA. Nevertheless, further studies are required to confirm the *in vivo* safety of EA2 at the lowest concentration, as *in vitro* assays evaluating

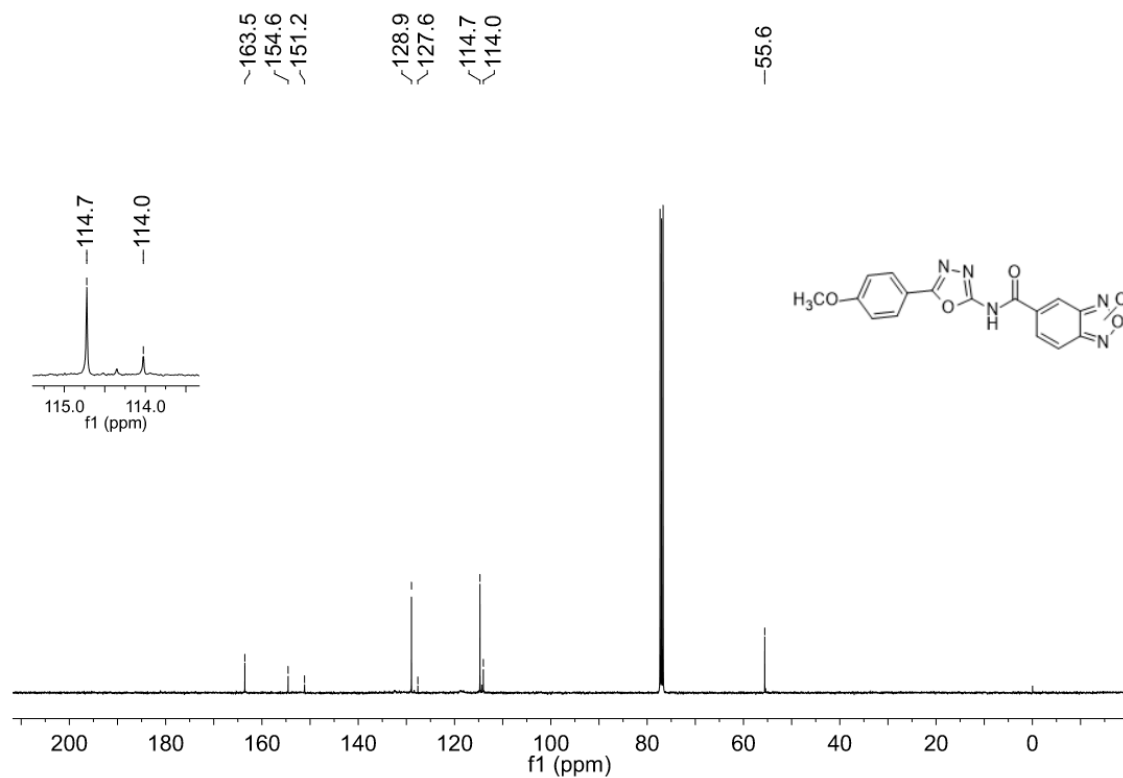
cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity are only the first line of research for the use of new drugs in biomedicine.

5. SUPPLEMENTARY MATERIAL

^1H NMR spectrum of compound **5** (EA2) in CDCl_3 , 400 MHz (δ , TMS).



^{13}C NMR spectrum of compound **5** (EAD) in CDCl_3 , 100 MHz (δ , TMS).



Acknowledgments:

The authors acknowledge the financial support of the following Brazilian agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCES

1. CASTRO, D., BOIANI, L., BENITEZ, D., HERNÁNDEZ, P., MERLINO, A., GIL, C., OLEA-AZAR, C., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., PORCAL, W. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44 (12), 5055-65.
2. CHUGUNOVA, E., BOGA, C., SAZYKIN, I., CINO, S., MICHELETTI, G., MAZZANTI, A., SAZYKINA, M., BURILOV, A., KHMELEVTSOVA, L., KOSTINA, N. Synthesis and antimicrobial activity of novel structural hybrids of benzofuroxan and benzothiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 93, 349–359.
3. DUTRA, L.A., DE ALMEIDA, L., PASSALACQUA, T.G., REIS, J.S., TORRES, F.A., MARTINEZ, I., PECCININI, R.G., CHIN, C.M., CHEGAEV, K., GUGLIELMO, S., FRUTTERO, R., GRAMINHA, M.A., DOS SANTOS, J.L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2014**, 58 (8), 4837-47, 2014.
4. JOVENÉ, C., CHUGUNOVA, E.A., GOUMONT, R. The properties and the use of substituted benzofuroxans in pharmaceutical and medicinal chemistry: a comprehensive review. *Mini Rev Med Chem.*, **2013**, 18 (8), 1089-136.
5. SHIPTON, M.; STUCHBURY, T.; BROCKLEHURST, K. Evaluation of benzofuroxan as a chromophoric oxidizing agent for thiol groups by using its reactions with papain, ficin, bromelain and low-molecular-weight thiols. *Biochem. J.*, **1977**, 161, (3), 627 – 37.
6. GARCÍA-FERRIS, C. e MORENO, J. Redox regulation of enzymatic activity and proteolytic susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Euglena gracilis*. *Photosynth Res.*, **1993**, 35, 55 – 66.

7. FARIAS, C. F. *et al.* Benzofuroxan derivatives N-Br and N-I induce intrinsic apoptosis in melanoma cells by regulating AKT/BIM signaling and display anti metastatic activity in vivo. *BMC Cancer.*, **2015**, 15 (807).
8. PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quím. Nova.*, **2009**. 32 (4), 1013-20.
9. MAYER, B., HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.*, **1997**, 22 (12), 477-81.
10. BOIANI, M., PIACENZA, L., HERNANDEZ, P., BOIANI, L., CERECETTO, H., GONZALEZ, M., DENICOLA, A. Mode of Action of Nifurtimox and N-oxide-containing Heterocycles Against Trypanosoma Cruzi: Is Oxidative Stress Involved? *Biochem Pharm.*, **2010**, 79 (12), 1736-45.
11. BOIANI, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; ORTIZ, S. T.; SERNA, E.; BILBAO, N. V.; SANABRIA, L.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R.; VEJA, C.; ROLAN, M.; GÓMEZBARRIO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49 (11), 3215-24.
12. BABICH, H., BORENFREUND, E. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. *Toxicol. in Vitro.*, v. 5, n., 1, p. 91-100, 1991.
13. GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutat. Res.*, **2000**, 455 (1-2), 21-28.
14. SNYDER, R.D; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.*, **2001**, 488 (2), 151-69.
15. OQUARE, B. Y. e TAYLOR, J. S. Synthesis of peptide nucleic acid FRET probes via an orthogonally protected building block for post-synthetic labeling of peptide nucleic acids at the 5-position of uracil. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19 (11), 2196-04.
16. NIU, P., KANG, J., TIAN, X., SONG, L., LIU, H., WU, J., YU, W., CHANG. J. Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-thiadiazoles via Sequential Condensation and I₂-Mediated Oxidative C–O/C–S Bond Formation. *J. Org. Chem.*, **2015**, 80 (2), 1018-24.
17. HAROUN, M.; HELISSEY, P.; GIORGI-RENAULT, S. New synthesis of 5,10-dioxyphenazine-2-carboxylic acid. *Synth. Commun.*, **2001**, 31 (15), 2329 – 34.

18. GÜEZ, C. M., SOUZA, R. O., FISCHER, P., LEÃO., M. F. M., DUARTE, J. A., BOLIGON, A. A., ATHAYDE, M. L., ZURAVISKI, L., OLIVEIRA, L. F. S., MACHADO, M. M. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, antigenotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Braz. J. Pharm., Sci.* **2017**, 53 (1), 1-12.
19. FLORIANO, J. M., DA ROSA, E., DO AMARAL, Q. D. F., ZURAVSKI, L., CHAVES, P. E. E., MACHADO, M. M., OLIVEIRA, L. F. S. Is tartrazine really safe? In silico and ex vivo toxicological studies in human leukocytes: a question of dose. *Toxicol. Res.*, **2018**, 7 (6), 1128-36.
20. LEÃO, M. F. M., DUARTE, J. A., SAUZEN, P. D., PICCOLI, J. C. E, OLIVEIRA, L. F. S., MACHADO, M. M. Cytotoxic and genotoxic effects of antihypertensives distributed in Brazil by social programs: Are they safe?. *Environ. Toxicol. Phar.*, **2018**, 63, 1-5.
21. SINGH, N. P., McCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell. Res.*, **1988**, 175 (1), 184-91.
22. SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **1975**, 31 (1), 9-15.
23. FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, **2000**, 455 (1), 81-95.
24. SCHWEIKL, H., SPAGNUOLO, G., SCHMALZ, G., Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J. Dent. Res.* **2006**, 85 (10), 870-77.
25. BARBIN, L. E., SAQUY, P. C., GUEDES, D. F., SOUSA-NETO, M. D., ESTRELA C., PÉCORÁ, J. D. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J. Endod.* **2008**, 34 (12), 1508-1514.
26. BARILE, F.A. Introduction to In Vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods. 1st Edition. New York: CRC Press, 1994. 96p.
27. TUCKER, J. D., PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* **1996**, 365 (1), 147-159.
28. BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. *APMIS*, **2013**, 121 (7), 569-81.

29. ARALDI, R.P.; DE MELO, T.C.; MENDES, T.B.; DE SÁ JÚNIOR, P.L.; NOZIMA, B.H.; ITO, E.T. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.*, **2015**, 72, 74-82.
30. BRAMBILLA, G., MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents, *Mutat. Res.*, **2009**, 612 (2), 115-49.
31. PACKER, L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete, *J. Sports Sci.* **1997**, 15, 353-63.
32. CADENAS. E., DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.*, **2000**, 29, 222–230.
33. MARTIN L. J. DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2008**, 67 (5), 377-87.
34. SHUKLA, P. K., JENA, N. R., MISHRA, P. C. Quantum theoretical study of molecular mechanisms of mutation and cancer: a review. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 81, 79-98.
35. MINKO, I. G., HARBUT, M.B., KOZEKOV, I.D., KOZEKOVA, A., JAKOBS, P.M., OLSON, S.B., MOSES, R.E., HARRIS, T.M., RIZZO, C.Z., LLOYD, R.S. Role for DNA polymerase in the processing of N2-N2-guanine interstrand crosslinks. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (25), 17075-82.
36. XU, X., MULLER, J. G., YE, Y., BURROWS, C. J. DNA-protein cross-links between guanine and lysine depend on the mechanism of oxidation for formation of C5 vs C8 guanosine adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (2), 703-9.
37. BALDISSERA, M. D., SAGRILLO, M. R., GRANDO, T, H., ROSA, L.D., DE SÁ, M. F., DA LUZ, S. C. A., SILVEIRA, S. O., NASCIMENTO, K., PERES, D. S., COPETTI, P, SILVA, A. S. STEFANI, L. M., MONTEIRO, S. G. Cytotoxic and genotoxic effects of the trypanocidal drug diminazene aceturate. *Comp Clin Pathol.* **2017**, 26, 219-27.
38. MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **1991**, 43, 109-42.
39. MONCADA, S, HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N engl. J. Med.* v. **1993**, 329 (27), 2002-12.

40. WINK, D.A. VODOVOTZ, Y., LAVAL, J. LAVAL, F., DEWHIRST, M. W., MITCHELL, J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*, **1998**, 19 (5), 711-721.
41. JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasit infections. *Microbiol. Rev.* **1995**, 59 (4), 533-547.
42. BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism.*, **1996**, 271, 1424-1437.
43. KUNDU, J.K., SURH, Y.J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Med.* **2012**, 52 (9), 2013-2037.
44. BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M.P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., JOKSIC, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M. R., ZIJNO, A., NORPPA, H., FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. **2007**, 28 (3), 625-31.
45. TODRES, Z. V. Chalcogenadiazoles: chemistry and applications. CRC Press: 2012. cap.1, p. 66.

ARTIGO II

O artigo II, intitulado “ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VITRO* e *IN VIVO* DE UM COMPOSTO BENZOFUROXANO DERIVADO FRENTE AO *Trypanosoma cruzi*”, relata a avaliação *in vitro* e *in vivo* do composto EA2 frente o *T. cruzi*, bem como, a avaliação das alterações hematológicas e do perfil hepático e renal em animais sadios e infectados com o *T. cruzi* submetidos ao tratamento com o referido composto.

IN VITRO and *IN VIVO* TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF A BENZOFUROXAN
DERIVATIVE AGAINST *Trypanosoma cruzi*

Letícia dos Santos Petry^{a,*}, João Cândido Pillar Mayer^b, Marjorie de Giacommeti^a, Dionatan Teixeira de Oliveira^c, Litiéria Razia Garzon^a, Ana Martiele Engelmann^d, Antônio Francisco Magalhães de Matos^a, Matheus Dellaméa Baldissera^e, Luciano Dornelles^b, Cinthia Melazzo de Andrade^d, Silvia Gonzalez Monteiro^a

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Chemistry, LabSelen-NanoBio, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

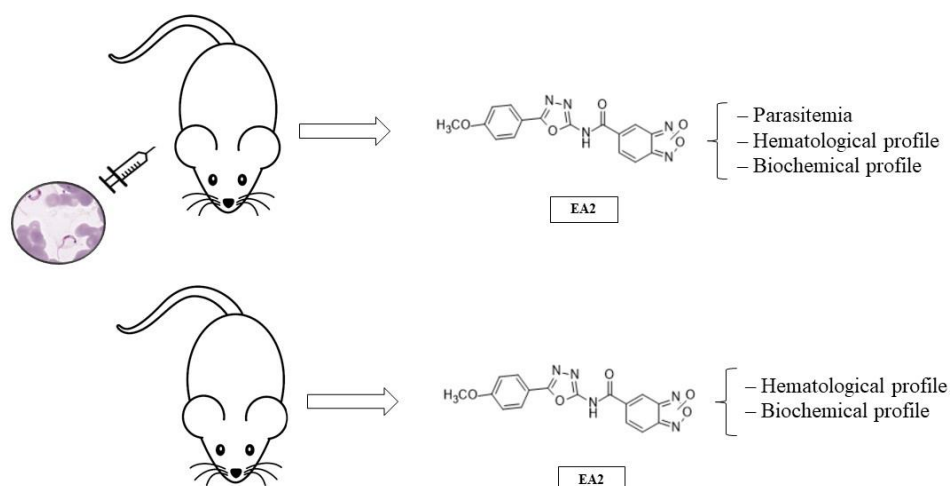
^cDepartment of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^dLaboratory of Veterinary Clinical Analyses, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^eLaboratory of Fish Physiology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* corresponding author: leticiaspetry@gmail.com

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a major public health problem and is described as one of the most neglected diseases worldwide. It affects about 6–7 million people. Currently, only two drugs are available for the treatment of this disease: nifurtimox and benznidazole. However, both drugs are highly toxic and have several side effects, which lead many patients to discontinue treatment. Moreover, these compounds show a significant curative

efficacy only in the acute phase of the disease. Therefore, searching for new drugs is necessary. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* activity of a benzofuroxan derivative (EA2) against *T. cruzi*, and to evaluate the hematological and biochemical changes induced by its treatment in animals infected with *T. cruzi*. The results were then compared with those of healthy controls. *In vitro* testing was first performed with *T. cruzi* epimastigote forms. In this experiment, EA2 was diluted at three different concentrations (0.25, 0.50, and 1%). *In vitro* evaluation of the trypanocidal activity was performed 24, 48, and 72 h after incubation. *In vivo* assays were performed using three different doses (10, 5, and 2.5 mg/kg). Mice were divided into 10 groups (five animals/group), wherein four groups comprised non-infected animals (A, G, H, I) and six groups comprised infected animals (B, C, D, E, F, J). Groups B and J represented the negative and positive controls, respectively. Groups G, H, and I were used to confirm that EA2 was not toxic to non-infected animals. Parasitemia was measured in infected animals and the hematological and biochemical profiles (urea, creatinine, albumin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and alkaline phosphatase) were evaluated in all animals. EA2 demonstrated *in vitro* trypanocidal activity at all concentrations tested. Although it did not demonstrate a curative effect *in vivo*, EA2 was able to retard the onset of parasitemia, and significantly reduced the parasite count in groups D and E (treated with 5 and 2.5 mg/kg, respectively). EA2 did not induce changes in hematological and biochemical parameters in non-infected animals, demonstrating that it is not toxic. However, further assessments should aim to confirm the safety of EA2 since this was the first *in vitro* and *in vivo* study conducted with this molecule.

Keywords: Chagas disease; EA2, Parasitemia; Hematological profile; Biochemical profile.

1. INTRODUCTION

Chagas disease is also known as American trypanosomiasis. It is an important zoonosis, caused by infection with the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* (CAMPBELL et al., 2004). This pathological disorder belongs to the group of neglected tropical diseases and is endemic in South and Central America. It is estimated that more than from 6 to 7 million people are currently infected worldwide (WHO, 2020). *T. cruzi* has a heteroxene life cycle. It moves between invertebrate hosts (Triatomines), which act as parasite vectors, and mammalian hosts (BRENER et al., 2000). Clinically, the disease develops in two phases: an acute phase, which can last 1–4 months and is characterized by high parasitemia and the typical absence of clinical

signs; and a chronic phase, which lasts for the entire life of the infected individual, with low parasitemia and clinical signs related to the affected organ (REY, 2001; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

In general, the treatment of Chagas disease is curative only in the acute phase. In this case, benznidazole and nifurtimox are the drugs of choice. These drugs have several side effects, such as rash, headache, and nausea, which can lead to patients discontinuing therapy, which should be maintained for up to 60 days. Moreover, both benznidazole and nifurtimox are highly toxic (WILKINSON; KELLY, 2009; CASTRO et al., 2006). Thus, it is necessary to seek new drugs, which present fewer side effects and are capable of treating the disease in its different stages. Benzofuroxan compounds are molecules capable of generating reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS), and especially nitric oxide (NO). NO is a potent antimicrobial agent, owing to the release of reactive species or the inhibition of enzymes essential to microorganisms (BOIANI et al., 2008). Molecules capable of releasing NO under physiological conditions have presented cytotoxic effects against a variety of pathogens, including *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, and *T. cruzi* (GALLI et al., 2005; OLEA -AZAR et al., 2005 BOIANI et al., 2008). Additionally, benzofuroxan compounds can be reduced to radical species in biological environments (OLEA-AZAR, 2003). Among the heterocycles present in compounds with potential antiparasitic activity, 1,2,4-, 1,3,4-, and 1,2,5-oxadiazoles are notable for their relative ease of synthesis (SANTAGADA, 2004; NIU, 2015; HAROUN, 2001) as well as their respective efficacy as antimalarials (SANTOS FILHO, 2016), anti-*Leishmania* (VERMA, 2019) and anti-trypanosomal molecules (AGUIRRE, 2005). Thus, based on the need to develop a new therapy capable of counteracting *T. cruzi* in its different phases without causing toxicity, the present study analyzed the *in vitro* and *in vivo* activity of a benzofuroxan derivative, presenting a 1,3,4-oxadiazole heterocycle (compound EA2) against *T. cruzi*.

2. MATERIAL AND METHODS

This study was previously approved by the ethics committee of this institution under number: 5243091018.

2.2 Benzofuroxan derivative compound

The tested compound was synthesized by LabSelen-NanoBio (Federal University of Santa Maria) and is named “5-((5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)

carbamoyl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-*N*-oxide” according to the IUPAC nomenclature, and in this work is referred as “compound EA2” (Fig. 1) (unpublished data).

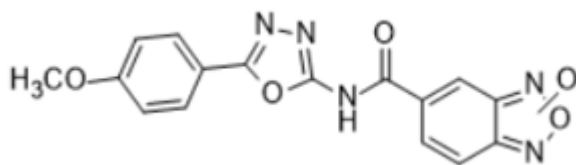


Figure 1. Benzofuroxan derivative EA2

2.3 *Trypanosoma cruzi* isolate

This study was performed in two consecutive steps (*in vitro* and *in vivo*). First, two mice (C1 and C2) were infected intraperitoneally with cryopreserved blood containing trypomastigote forms of *T. cruzi* (strain Y). This procedure was performed in order to obtain a high number of parasites for use in *in vitro* assays and to infect a further four animals and serve as an inoculant for mice *in vivo*.

2.4 *In vitro* assay

The test was performed to assess the presence of live and dead parasites within 72 h of treatment with compound EA2. Seven-days after infection, when parasitemia was high, a C1 mouse was anesthetized and blood containing the trypomastigote forms was collected by cardiac puncture. Liver Infusion Triptose (TIP) culture medium was used in this experiment. A total of 500 μ L of blood was added to the medium and incubated at 37°C for 7 days to determine the number of epimastigotes, using the Pizzi-Brener method (BRENER, 1962). The assays were performed in 96-well culture microplates, containing the compound at concentrations of 0.25, 0.50, and 1% in a final volume of 150 μ L containing 10⁶ epimastigotes/mL. The compounds were diluted in 4% dimethyl sulfoxide (DMSO). Benznidazole was used as positive control and distilled water was used as negative control. DMSO 4% was used to confirm that the vehicle would have no activity on epimastigote forms. The plates were maintained at 37°C for 72 h and read every 24 h. The assays were performed in triplicate and the parasites were counted using the Pizzi-Brener method (BRENER, 1962).

2.5 *In vivo* assays

This study aimed to verify the action of the compound in animals infected with *T. cruzi* parasite, 7 days after the beginning of the experiment.

2.5.1 Animal model and experimental design

Fifty female mice, aged 60-days old and weighing an average of 23 ± 0.7 g, were randomly divided into 10 groups of five animals each. The animals were kept in cages in an experimental room with a 12 h light/dark cycle, a controlled temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$, and 70% humidity. All animals were fed with commercial feed and water *ad libitum*, and allowed to adapt for 15 days.

Animals belonging to infected groups were inoculated intraperitoneally with blood containing 10^4 trypomastigote forms of *T. cruzi* (strain Y), obtained from a previously infected mouse (C2). The experimental compound was diluted in 4% DMSO. Non-infected animals were exposed to EA2 compound to confirm that this treatment did not cause any toxic biochemical changes, including liver and kidney damage. Infected animals, treated with 4% DMSO, were used to confirm the efficacy of the compound, given that some diluents may affect some microorganisms. All treatments were administered intraperitoneally and drugs were administered daily.

Group A: Non-infected and non-treated

Group B: Infected and non-treated (negative control)

Group C: Infected and treated with 10 mg/kg of compound

Group D: Infected and treated with 5 mg/kg of compound

Group E: Infected and treated with 2.5 mg/kg of compound

Group F: Infected and treated with 4% DMSO

Group G: Non-infected and treated with 10 mg/kg of compound

Group H: Non-infected and treated with 5 mg/kg of compound

Group I: Non-infected and treated with 2.5 mg/kg of compound

Group J: Infected and treated with benznidazole (positive control)

2.5.2 Evaluation of blood parasitemia

Parasitemia was evaluated daily, from day 1 to day 7 after infection. The number of trypomastigote forms in the circulation was monitored by counting the number of mobile parasites in 5 μL of fresh blood collected from the tail of each animal, as previously recommended (BRENER, 1962).

2.5.3 Sample collection

Seven-days post-infection, animals were anesthetized with isoflurane and e whole blood was collected by cardiac puncture. The blood was then stored in two tubes, one containing the anticoagulant ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) and used to perform a complete blood count, and the other without anticoagulant, which was used to obtain serum to determine the hepatic and renal biochemical profile of the animals.

2.5.4 Sample processing

Hemoglobin concentration, and red blood cell and platelet counts were determined using an automatic blood cell counter (Mindray bc 2.800). Urea, creatinine, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP) were measured using commercial kits (Bioclin) and the results were obtained by reading the samples in an automatic device (BS-120 Mindray).

2.6 Statistical analyses

The significance of the results of *in vitro* tests and parasitemia was assessed by analysis of variance with one degree of freedom ($p < 0.05$). All variables were analyzed for normality and homogeneity with the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Differences between groups were assessed by applying the Tukey test with a 5% significance level, using the program SAS (version 9.2). Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean. Hematological variables and the biochemical profile were analyzed by one-way ANOVA using the statistical program 7 ($p < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm standard error.

3. RESULTS

In vitro assay

No growth of epimastigote forms was observed in culture medium at any concentrations of the EA2 compound tested. Similarly, no growth of epimastigote forms was observed in controls treated with the reference drug benznidazole. However, the presence of epimastigote forms was detected in samples treated with 4% DMSO and in negative controls, thus validating the assay (Fig. 2). Table 1 shows the efficacy of the treatment at different concentrations, as used in the *in vitro* test.

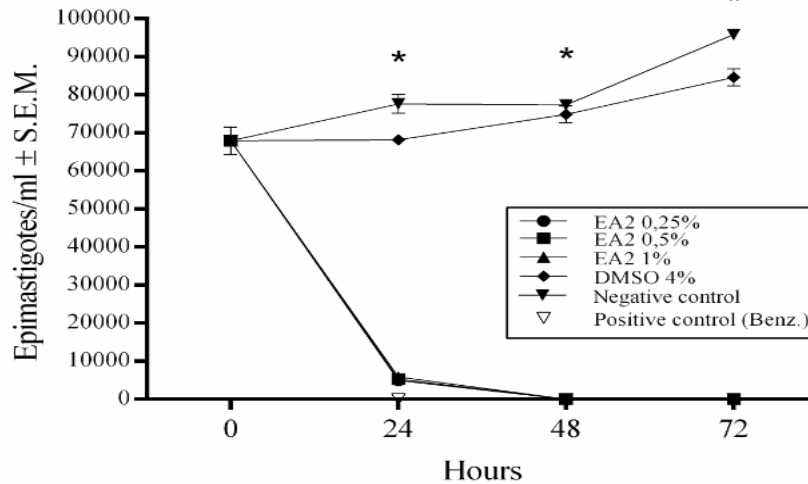


Figure 2: *In vitro* activity of different concentrations of EA2 compound against *Trypanosoma cruzi*. Asterisks indicate a significant difference between groups ($p < 0.05$).

Table 1: Number of epimastigote forms and efficacy of different concentrations of EA2 compound tested *in vitro*.

Time Treatment	Epimastigotes/mL				Efficacy (%)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
EA2-0.25%	67946 ± 6228 ^a	4981 ± 1208 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0	93.6 ± 1.6	100 ± 0	100 ± 0
EA2, 0.5%	67946 ± 6228 ^a	5308 ± 374 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0	93.2 ± 0,5	100 ± 0	100 ± 0
EA2, 1%	67946 ± 6228 ^a	5880 ± 883 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0	92.4 ± 1,1	100 ± 0	100 ± 0
DMSO, 4%	67946 ± 6228 ^a	68191 ± 2354 ^c	74888 ± 3806 ^b	84606 ± 3907 ^b	0 ± 0	12.2 ± 3	3.2 ± 4.9	11.8 ± 4.1
CP (Benz)	67946 ± 6228 ^a	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

Data are expressed as the mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate a significant difference between groups ($p < 0.05$).

In vivo assay:

Epimastigote forms were observed in the circulation 2 days after infection in negative controls and in infected mice treated with 4% DMSO. However, in other groups of infected animals treated with the EA2 compound, epimastigote forms were detected in blood only at 4 days post-infection. Moreover, mice treated with lower doses (2.5 and 5 mg/kg) of the compound showed a lower degree of parasitemia compared to animals treated with a higher dose (10 mg/kg) (Fig. 3). Parasitemia differed significantly between groups, as shown in Table 2.

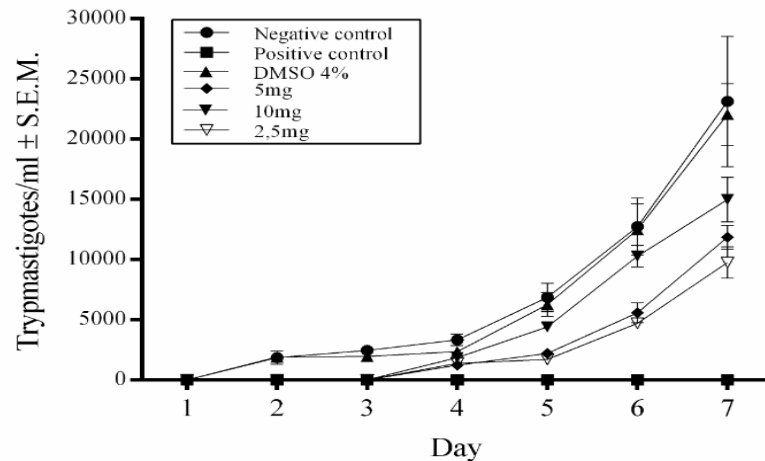


Figure 3: Number of trypomastigote forms in blood smears of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and subjected to different treatments for 7 days.

Table 2: Number of trypomastigote forms in blood smears of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and subjected to different treatments for 7 days.

Day Treatment	Parasitemia						
	1	2	3	4	5	6	7
B	0 ± 0 ^a	1862 ± 1220 ^b	2450 ± 0 ^b	3332 ± 1062 ^b	6860 ± 3239 ^b	12740 ± 5323 ^b	23128 ± 12109 ^b
C	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	1862 ± 639 ^{cd}	4410 ± 1396 ^b	10290 ± 2020 ^{bc}	14994 ± 4137 ^{bc}
D	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	1225 ± 387 ^c	2205 ± 1182 ^c	5586 ± 1853 ^{cd}	11858 ± 2202 ^c
E	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	1381 ± 561 ^{cd}	1715 ± 612 ^c	4723,6 ± 289 ^d	9760,8 ± 2925 ^c
F	0 ± 0 ^a	1911 ± 438 ^b	1960 ± 775 ^b	2352 ± 219 ^{bc}	6272 ± 4273 ^b	12495 ± 4785 ^b	22050 ± 5738 ^b
J	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

The data are expressed as the mean ± standard deviation.

Different letters in the same column indicate a significant difference between groups ($p < 0.05$). Group B: infected and not treated; Group C: infected and treated with 10 mg/kg of compound; Group D: infected and treated with 5 mg/kg of compound; Group E: infected and treated with 2.5 mg/kg of compound; Group F: infected and treated with 4% DMSO; Group J: infected and treated with benznidazole (positive control).

Hematological variables are presented in Table 3. There was a significant difference in erythrocytes and hematocrit between groups B, C, E, F, and J compared with groups A, D, G, H, and I. Hemoglobin levels differed significantly in groups B, C, F, and J compared with the other groups. A significant reduction in platelet count was observed in infection mice compared with non-infected animals. No statistical difference was observed in any groups in relation to the following parameters: VCM (mean corpuscular volume), CHCM (mean corpuscular hemoglobin concentration), and total protein.

Table 3: Hematological variables in non-infected mice and mice infected with *T. cruzi* following treatment with different doses of EA2 compound.

	Erythrocytes ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	Hemoglobin	VCM	CHCM	Ht (%)	Total protein	Platelets (per μL)
A	8.81 \pm 0.15 ^a	13.5 \pm 0.22 ^a	45.14 \pm 0.47 ^a	33.64 \pm 0.18 ^a	42.96 \pm 0.67 ^a	5.04 \pm 0.24 ^a	923.000 \pm 67.085 ^a
B	7.27 \pm 0.24 ^b	11.34 \pm 0.45 ^b	46.30 \pm 0.91 ^a	33.68 \pm 0.25 ^a	33.62 \pm 1.14 ^b	4.84 \pm 0.11 ^a	273.800 \pm 42.605 ^b
C	7.43 \pm 0.36 ^b	11.50 \pm 0.64 ^b	46.28 \pm 0.51 ^a	33.38 \pm 0.23 ^a	34.36 \pm 1.70 ^b	4.96 \pm 0.14 ^a	244.200 \pm 31.251 ^b
D	8.71 \pm 0.29 ^a	13.85 \pm 0.48 ^a	45.97 \pm 0.40 ^a	34.55 \pm 0.22 ^a	40.02 \pm 1.16 ^a	4.90 \pm 0.10 ^a	219.750 \pm 43.303 ^b
E	7.58 \pm 0.18 ^b	12.08 \pm 0.28 ^a	47.20 \pm 0.98 ^a	33.78 \pm 0.17 ^a	35.72 \pm 0.68 ^b	4.88 \pm 0.16 ^a	289.200 \pm 34.482 ^b
F	7.28 \pm 0.20 ^b	11.32 \pm 0.22 ^b	46.32 \pm 0.93 ^a	33.76 \pm 0.26 ^a	33.4 \pm 0.97 ^b	4.80 \pm 0.06 ^a	273.200 \pm 42.588 ^b
G	9.28 \pm 0.31 ^a	15.15 \pm 0.27 ^a	47.72 \pm 0.95 ^a	34.27 \pm 0.10 ^a	44.15 \pm 0.88 ^a	5.00 \pm 0.08 ^a	968.750 \pm 61.855 ^a
H	9.16 \pm 0.19 ^a	15.22 \pm 0.21 ^a	47.86 \pm 0.56 ^a	34.72 \pm 0.33 ^a	43.76 \pm 0.61 ^a	5.16 \pm 0.27 ^a	952.400 \pm 92.679 ^a
I	9.09 \pm 0.26 ^a	14.86 \pm 0.58 ^a	47.74 \pm 0.67 ^a	34.20 \pm 0.27 ^a	43.34 \pm 1.52 ^a	5.12 \pm 0.08 ^a	916.600 \pm 81.358 ^a
J	7.20 \pm 0.30 ^b	11.44 \pm 0.92 ^b	45.14 \pm 0.65 ^a	33.16 \pm 0.32 ^a	33.04 \pm 1.31 ^b	4.84 \pm 0.19 ^a	240.800 \pm 69682.85 ^b

The data are expressed as the mean \pm standard deviation.

Different letters in the same column indicate significant differences between groups ($p < 0.05$). Group A: non-infected and non-treated; Group B: infected and non-treated; Group C: infected and treated with 10 mg/kg of compound; Group D: infected and treated with 5 mg/kg of compound; Group E: infected and treated with 2.5 mg/kg of compound; Group F: infected and treated with 4% DMSO; Group G: non-infected and treated with 10 mg/kg of compound; Group H: non-infected and treated with 5 mg/kg of compound; Group I: non-infected and treated with 2.5 mg/kg of compound; Group J: infected and treated with benznidazole (positive control).

Table 4 shows the biochemical profiles of mice. There was a significant difference in albumin, AST, and ALT in groups B, C, D, E, F, and J compared with groups A, G, H, and I. AP differed only in group E compared with the other groups. Differences in urea concentration were found in groups D, F, and J compared with the other groups. A statistical difference was observed for creatinine, but only in Group J.

Table 4: Biochemical profile of non-infected mice and mice infected with *T. cruzi* following treatment with EA2 compound at different doses.

	Albumin (mg/dL)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Creatinine (mg/dL)	FA (UI/L)	Urea (mg/dL)
A	2.42 \pm 0.09 ^a	35.60 \pm 6.11 ^a	141.20 \pm 7.16 ^a	0.44 \pm 0.07 ^a	106.00 \pm 5.95 ^a	38.40 \pm 1.16 ^a
B	2.00 \pm 0.05 ^b	113.20 \pm 8.6 ^b	580.60 \pm 24.86 ^b	0.34 \pm 0.02 ^a	102.00 \pm 8.53 ^a	51.40 \pm 4.99 ^a
C	1.88 \pm 0.04 ^b	129.40 \pm 10.81 ^b	616.20 \pm 32.08 ^b	0.38 \pm 0.02 ^a	94.20 \pm 3.35 ^a	47.20 \pm 4.75 ^a
D	2.00 \pm 0.14 ^b	199.00 \pm 14.75 ^c	898.75 \pm 100.43 ^c	0.37 \pm 0.02 ^a	88.00 \pm 4.54 ^a	62.00 \pm 5.94 ^b
E	1.90 \pm 0.06 ^b	132.40 \pm 26.43 ^b	549.80 \pm 60.34 ^b	0.46 \pm 0.06 ^a	78.80 \pm 3.61 ^b	45.00 \pm 2.64 ^a
F	1.94 \pm 0.06 ^b	107.20 \pm 6.5 ^b	602.00 \pm 24.58 ^b	0.44 \pm 0.06 ^a	100.20 \pm 4.30 ^a	56.80 \pm 4.28 ^b
G	2.74 \pm 0.02 ^a	23.00 \pm 3.9 ^a	146.40 \pm 37.82 ^a	0.34 \pm 0.11 ^a	98.00 \pm 6.64 ^a	42.80 \pm 3.15 ^a
H	2.48 \pm 0.04 ^a	38.20 \pm 11.49 ^a	127.20 \pm 11.45 ^a	0.38 \pm 0.02 ^a	85.80 \pm 4.07 ^a	39.60 \pm 0.74 ^a
I	2.56 \pm 0.08 ^a	59.40 \pm 9.78 ^a	196.20 \pm 19.55 ^a	0.42 \pm 0.07 ^a	94.20 \pm 5.02 ^a	42.20 \pm 2.05 ^a
J	2.05 \pm 0.12 ^b	201.5 \pm 22.94 ^c	859.5 \pm 141.82 ^c	0.76 \pm 0.11 ^b	101.62 \pm 3.68 ^a	66.25 \pm 2.75 ^b

The data are expressed as the mean \pm standard deviation.

Different letters in the same column indicate a significant difference between groups ($p < 0.05$). Group A: non-infected and non-treated; Group B: infected and non-treated; Group C: infected and treated with 10 mg/kg of compound; Group D: infected and treated with 5 mg/kg of compound; Group E: infected and treated with 2.5 mg/kg of compound; Group F: infected and treated with 4% DMSO; Group G: non-infected and treated with 10 mg/kg of compound; Group H: non-infected and treated with 5 mg/kg of compound; Group I: non-infected and treated with 2.5 mg/kg of compound; Group J: infected and treated with benznidazole (positive control).

4. DISCUSSION

This is the first study to evaluate the trypanocidal activity of EA2 compound against *T. cruzi* and to investigate the hematological and biochemical changes induced by treating non-infected and *T. cruzi* infected animals with the compound. EA2 compound is a molecule derived from benzofuroxan. To date, compounds containing a benzofuroxanic nucleus have been investigated in several studies on pharmaceutical and medicinal chemistry as they present antimicrobial, antiparasitic, and antitumor activity (CERECETTO et al., 1999; BOIANI et al., 2008; JORGE et al., 2009; FARIAS et al., 2015).

The present study demonstrated *in vitro* trypanocidal activity exerted by EA2 compound against *T. cruzi*. Although there was no curative efficacy in animals infected with *T. cruzi* and treated with EA2 compound at different doses (10, 5, and 2.5 mg/kg), the treatment was able to retard the onset of parasitemia and significantly reduce the number of trypomastigote forms in groups D and E compared to the negative controls. Benzofuroxan derivatives can generate ROS/RNS (BOIANI et al., 2006; PAULA et al., 2009). Cerecetto et al. (1999) investigated the trypanocidal activity of some molecules derived from benzofuroxan and compared their activity to nifurtimox, a drug used for the treatment of Chagas disease. Those authors showed that the *N*-oxide ratio of these derivatives is important, since removal of the *N*-oxide group results in a loss of trypanocidal activity (BOIANI et al., 2008; HERNANDEZ et al., 2013).

As the *N*-oxide ratio is responsible for the generation of reactive species, and NO is the main reactive species generated, ROS/RNS production contributes to the destabilization of the *Trypanosoma* cell membrane. NO has been described as crucial for the control of parasite load since it is capable of killing the parasite while inside the cells (GUTIERREZ et al., 2009; SANMARCO et al., 2016). NO is capable of interrupting the life cycle of *T. cruzi* by inactivating important enzymes, such as cruzipain, which plays an essential role in the cell invasion and nutrition of *Trypanosoma* (VENTURINI et al., 2000). Some authors have reported that the *N*-oxide ratio of the heterocycle is also capable of interfering with the mitochondrial respiratory chain of the parasite, thus damaging the protozoan by inhibiting mitochondrial respiration (CASTRO et al., 2009).

This results of the present study indicate that the lower doses of EA2 compound tested (2.5 and 5 mg/kg) were more effective at preventing an increase in parasitemia, compared with the higher dose (10 mg/kg). This can be explained by the release of NO; when NO production is exacerbated, NO starts to present a pro-inflammatory effect. According to Ribeiro et al. (2007), high amounts of NO in mice following experimental infection with *T. cruzi* were capable of damaging DNA in cardiac and splenic cells, resulting in cell death. Moreover,

Martins et al. (1998) associated high levels of NO with the peak of parasitemia induced by *T. cruzi* infection. Thus, although NO presents a beneficial role in counteracting the infection induced by the protozoan, when there is an increase in the levels of this molecule, NO starts to demonstrate deleterious effects and becomes pro-inflammatory (ARANTES et al., 2004).

In the evaluation of hematological parameters, there was a significant reduction in hematocrit and erythrocytes in mice belonging to groups B, C, E, F, and J. There was no statistical difference in these parameters between mice in group D (infected and treated with 5 mg/kg of EA2 compound) and those in group A (non-infected and non-treated). This demonstrated that treatment with 5 mg/kg of compound was capable of protecting animals from developing anemia. Thrombocytopenia was observed in all animals in the infected groups. The presence of anemia and thrombocytopenia in patients with Chagas disease is well documented (CHAGAS, 1909; CARDOSO; BRENER, 1980; MARCONDES et al, 2000; GUEDES et al., 2011). The probable cause of these disorders is bone marrow suppression, associated with the infection and/or a reduced cellular life span (MARCONDES et al., 2000). In addition, *T. cruzi* increases the expression of *trans*-sialidase enzyme, which is a virulent factor of the parasite. This enzyme is involved in the development of thrombocytopenia. In one study, mice receiving a single injection of this enzyme presented a 50% reduction in platelet count, and thrombocytopenia lasted as long as the enzyme was present in the body (TRIBULATTI et al., 2004).

There was no significant difference in the values of VCM and CHCM between groups, indicating that the anemia presented by infected animals was normocytic-normochromic. This was due to the inflammatory nature of *T. cruzi* infection, since, during the inflammatory process, there are changes in iron homeostasis, proliferation of erythroid progenitors, and production of erythropoietin, as well as a reduction in the erythrocyte life span (THRALL et al., 2014). However, the short duration of the infection may also explain the maintenance of VCM and CHCM values, since the bone marrow of these animals did not have enough time to respond to the injury caused by the infection. This results in the maintenance of these parameter (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Regarding the biochemical profile of the animals, the serum activities of ALT and AST in infected mice were significantly higher compared to those of non-infected animals (Table 4). This has been reported for patients affected by Chagas disease, and strongly suggests the development of infection-driven liver damage (LARANJA et al., 1948; PINTO et al., 2008; SANTOS et al., 2020; THRALL et al 2014.). The treatment of non-infected animals did not alter the serum activity of these enzymes, indicating that the compound did not induce liver

damage. ALT and AST are important liver markers and can indicate drug-induced liver toxicity. Therefore, the use of techniques to monitor changes in the activity of these enzymes is crucial for ensuring the safety of new drugs (SOOKOIAN; PIROLA, 2015; TARRANT; MEYER; KATAVOLOS, 2013).

In infected groups, mice presented significantly lower levels of serum albumin compared with non-infected animals (Table 4). Hypoalbuminemia was described in patients with Chagas disease by Laranja et al. (1948). This might be related to liver changes, since animals, in infected groups presented changes in the serum activities of ALT and AST. However, this could also be due to the inflammation induced by *T. cruzi*, since albumin is an acute negative phase protein and during inflammation its levels are normal or slightly reduced. This was observed in the present study (Table 3), where no significant differences were observed in plasma proteins between infected and non-infected mice. When the values found in this study were compared with those described in the literature (THRALL et al., 2014), a slight reduction in plasma proteins was observed in infected animals, supported the hypothesis that hypoalbuminemia is due to the inflammation caused by the protozoan (SCOTT, 2011).

There was no significant difference in the activity of serum AP between infected and non-infected mice, except in group E (animals infected and treated with EA2 compound at 2.5 mg/kg). However, compared to the literature, serum AP activity, presented by group E was within the reference range for this species (THRALL et al., 2014).

A significant difference in creatinine concentration was only found in group J. The increased levels of serum creatinine in these mice were associated with a significant increase in the levels of serum urea. This indicates that treatment with benznidazole induced kidney damage in infected mice, as there was no significant difference in these parameters between infected and non-treated animals (group B). Nephrotoxicity induced by benznidazole treatment has been well described in the literature (CASTRO et al., 2006). The levels of serum urea also differed significantly between groups D and F. However, an increase in urea concentration alone is not sufficient to confirm the occurrence of kidney damage in these animals, since, when the glomerular filtration rate is reduced, there is a simultaneous increase in urea and creatinine concentrations. Serum urea levels can also be increased by high protein intake and gastrointestinal bleeding (THRALL et al., 2014). However, in the present study, high protein intake can be ruled out, since all animals received the same commercial feed.

Upper gastrointestinal bleeding was described by Pinto et al. (2008) in a patient with acute Chagas disease, which may explain the increased levels of serum urea in animals belonging to groups D and F. Moreover, thrombocytopenia occurred in these groups, which

supports the hypothesis of gastrointestinal bleeding. However, we cannot confirm that this was the reason for the increased levels of serum urea, since the presence of fecal occult blood in animals was not evaluated (THRALL et al., 2014, STOCKHAM; SCOTT, 2011). There was no statistical difference in the serum levels of urea and creatinine between the non-infected and non-treated mice, and non-infected and treated animals, which indicates that the EA2 compound does not induce kidney damage at the tested doses.

Therefore, we conclude that a dose of 5 mg/kg was able to prevent the development of anemia induced by *T. cruzi*, but none of the tested concentrations prevented the occurrence of biochemical changes caused by the infection. No curative efficacy of this compound was observed in infected and treated animals. However, the compound was able to retard the onset of parasitemia, as well as significantly reducing parasite count in groups D and E, compared with the negative controls. Moreover, the EA2 compound did not cause changes in the serum activity of liver enzymes and no changes in the serum levels of urea and creatinine were observed in non-infected and treated animals. Furthermore, no hematological changes were induced by the EA2 compound. These data are of the utmost importance for future work, since this initial study supported the safety of this compound. However, confirmation is required through future analyses.

Acknowledgments:

The authors acknowledge the financial support by the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

AGUIRRE, G. BOIANI, L.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; PORCAL, W.; DENICOLA, A.; MÖLLER, M.; THOMSON, L.; TÓRTORA, V. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide Derivatives as Potential Antitrypanosomal Drugs. Part 3: Substituents-clustering Methodology in the Search for New Active Compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 23, 6324 – 6335, 2005.

ARANTES, R.M., MARCHE, H. H., BAHIA, M. T., CUNHA, F. Q., ROSSI, M. A., SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation

in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *The American Journal of Pathology*, n. 164, v. 4, p. 1361-68, 2004.

BOIANI, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; ORTIZ, S. T.; SERNA, E.; BILBAO, N. V.; SANABRIA, L.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R.; VEJA, C.; ROLAN, M.; GÓMEZBARRIO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. *Journal Medicine Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 3215-24, 2006.

BOIANI, L., AGUIRRE, G., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., CHIDICHIMO, A., CAZZULO, J.J., BERTINARIA, M., GUGLIELMO, S. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as antitrypanosomatid agents: mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 7900-7, 2008.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.

CAMPBELL, D. A., WESTENBERGER, S. J., STURM, N. R. The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n. 6, p. 549-62, 2004.

CARDOSO, J., BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 75, n. 3-4, p. 97-104, 1980.

CASTRO, J. A. et al. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, n. 6, p. 471-479, 2006.

CASTRO, D., BOIANI, L., BENITEZ, D., HERNÁNDEZ, P., MERLINO, A., GIL, C., OLEA-AZAR, C., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., PORCAL, W. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 12, p. 5055-65, 2009.

CERECETTO, H., Di MAIO, R., GONZÁLEZ, RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide

Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure-Activity Relationships. *Journal Medicine Chemistry*, v. 42, p. 1941-50, 1999.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. 1909.

FARIAS, C. F., MASSAOKA, M. H., GIROLA, N., AZEVEDO, R. A, FERREIRA³, A. K., JORGE, S. D., TAVARES, L. C., FIGUEIREDO, C. R., TRAVASSOS, L.R. Benzofuroxan derivatives N-Br and N-I induce intrinsic apoptosis in melanoma cells by regulating AKT/BIM signaling and display anti metastatic activity in vivo. *Bmc Cancer*, n. 15, p. 807-18.

GALLI, U.; LAZZARATO, L.; BERTINARIA, M.; SORBA, G.; GASCO, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.40, p. 1335– 40, 2005.

GUEDES, P. M.M M., VELOSO, M. V., MINEO, T. W. P., SILVA, J. S., CREPALDE, G., CALDAS, I. S., NASCIMENTO, M. S. L., LANA, M., CHIARIS, E., GALVÃO, L. M. C., BAHIA, M. T. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 151-156, 2011.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 236-245, 2009.

HAROUN, M.; HELISSEY, P.; GIORGI-RENAULT, S. New synthesis of 5,10-dioxyphenazine-2-carboxylic acid. *Synthetic Communications*, v. 31, n. 15, p. 2329 – 2334, 2001.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*., v. 59, p. 64–74, 2013.

JORGE, S.D; MASUNARI, A.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PASQUALOTO, K.F.M.; TAVARES, L.C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*., v. 17, 3028–3036, 2009.

- LARANJA, F. S., DIAS, E., NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.
- MARCONDES, M. C. G., BORELLI, P. YOSHIDA, N., RUSSO, N. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes and infection*, v. 2, n. 4, p. 347-52, 2000.
- MARTINS, G. A., CARDOSO, M.A., ALIBERTI, J. C., SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* v. 63, n. 2, p. 113-20, 1998.
- NIU, P., KANG, J., TIAN, X., SONG, L., LIU, H., WU, J., YU, W., CHANG. J. Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-thiadiazoles via Sequential Condensation and I₂-Mediated Oxidative C–O/C–S Bond Formation. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 80, n. 2, p. 1018-24, 2015.
- PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova.*, v. 32, n. 4, p. 1013-20, 2009.
- OLEA-AZAR, C. RIGOL, C.; MENDIZÁBAL, F.; BRIONES, R.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; RISSO, M.; GONZÁLEZ, M.; PORCAL, W. Electrochemical and microsomal production of free radicals from 1,2,5-oxadiazole N-oxide as potential antiprotozoal drugs. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, v. 59, n. 1, p. 69 – 74, 2003.
- OLEA-AZAR, C., RIGOL, C MENDIZÁBAL, F., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., MORELLO, A., REPETTO, Y., MAYA, J. D. Novel Benzo[1,2-*c*]1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives as Antichagasic Agents: Chemical and Biological Studies. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 2, p. 294-301, 2005.
- PINTO, A. Y, N., VALENTE, S. A., VALENTE, V. C., FERREIRA Jr, A. G., COURA, J. R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 6, p.602-14, 2008.
- RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388- 1402, 2010.

- REY, L. Parasitologia. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.
- RIBEIRO, D., CALVI, S. A., PICKA, M. M., PERSI, E., CARVALHO, T. B., CAETANO, P.K., NAGOSHI, R. L., LIMA, C. R. G., MACHADO, J. M., SALVADORI, D. M. F. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 116, n. 3, p. 296-301, 2007.
- SANMARCO, L. M., VISCONTI, L. M., EBERHARDT, RAMELLO, R. C., PONCE, N. E., SPITALE, N. B., VOZZA, M. L., BERNARDI, G. A., GEA, S., MINGUEZ, A. R., AOKI, M. P. IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*. v., 7, p. 1-12, 2016.
- SANTOS, V. R. C., ANTUNES, D., SOUZA, D. S. M., MOREIRA, O. C., LIMA, I. C. A., FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A., LOBO, J. P., MEIS, E., COURA, J. R., SAVINO, W., JUNQUEIRA, V., MEIS, J. Human acute Chagas disease: changes in factor VII, activated protein C and hepatic enzymes from patients of oral outbreaks in Pará State (Brazilian Amazon). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, p.1-6, 2020.
- SANTOS FILHO, J. M., QUEIROZ E SILVA, D. M. A.; MACEDO, T. S.; TEIXEIRA, H. M. P.; MOREIRA, D. R. M.; CHALLAL, S.; WOLFENDER, J.-L. Conjugation of *N*-acylhydrazones and 1,2,4-oxadiazole leads to the identification of active antimalarial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 22, 5693 – 5701, 2016.
- SANTAGADA, V., SANTAGADA, V.; FRECENTESE, F.; PERISSUTTI, E.; CIRILLO, D.; TERRACCIANO, S.; CALIENDO, G. A suitable 1,2,4-oxadiazole synthesis by microwave irradiation. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 17, p. 4491-4493, 2004.
- SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 3, p. 711-725, 2015.
- STOCKHAM, S. L., SCOTT, M. A. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 744.
- TARRANT, J.; MEYER, D.; KATAVOLOS, P. Use of optimized minotransferase methods in regulated preclinical studies. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 42, n. 4, p. 535-538, 2013.

THRALL, M. A., WEISER, G., ALLISON, R. W., CAMPBELL, T. W. 2^a Edição. Rio de Janeiro: Roca LTDA., 2014. 688 p.

TRIBULATTI, M. V., MUCCI, J., ROOIJEN, N. V., LEGUIZAMO´N, M. S., CAMPETELLA, O. The *trans*-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia during Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic

Acid Contents. *Infection and Immunity*, v. 73, n.1, p. 1-7, 2004.

VENTURINI, G., SALVATI, L., MUOLO, M., COLASANTI, M., GRADONI, L., ASCENI, P. Nitric Oxide Inhibits Cruzipain, the Major Papain-like Cysteine Proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 270, n., 1, p. 437-41, 2000.

VERMA, G. KHAN, M. F.; NAINWAL, L. M.; ISHAQ, M.; AKHTER, M.; BAKHT, A.; ANWER, T.; AFRIN, F.; ISLAMUDDIN, M.; HUSAIN, I.; ALAM, M. M.; SHAQUIQUZZAMAN. Targeting malaria and leishmaniasis: Synthesis and pharmacological evaluation of novel pyrazole-1,3,4-oxadiazole hybrids. Part II. *Bioorganic Chemistry*, v. 89, n. 102986, 2019.

WHO, 2020. World Health Organization. Chagas disease. (**American Trypanosomiasis**). Disponível Em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1> Acesso em: 20 abril 2020.

WILKINSON, S. R., KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 29, p. 1-25, 2009.

Highlights

- Drugs used to treat Chagas disease have many side effects.
- First study evaluating the compound EA2, *in vitro* and *in vivo*.
- EA2 delayed the onset of parasitemia and reduced the count of trypomastigote forms.
- Uninfected and treated animals showed no changes in hematological and biochemical profile.

4. DISCUSSÃO

A doença de Chagas, é descrita como uma doença tropical negligenciada, afetando cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2020). Atualmente, apenas dois medicamentos estão disponíveis para o tratamento desta enfermidade, o Bz e o Nfx, contudo estes fármacos apresentam diversos efeitos colaterais e o índice de cura é elevado apenas na fase aguda da doença (CANÇADO, 1999; COURA; CASTRO, 2002; OLIVEIRA et al., 2008; RASSI JR, RASSI; MARIN-NETO, 2010). Sendo assim, a presente Tese buscou uma alternativa no tratamento da doença de Chagas.

Este estudo foi o primeiro avaliando o composto EA2, tanto em relação a sua genotoxicidade e citotoxicidade *in vitro*, quanto a sua atividade frente ao *T. cruzi* (*in vitro* e *in vivo*), além de avaliar também as alterações bioquímicas e hematológicas provocadas em animais infectados com o *T. cruzi* e em animais sadios tratados com o composto EA2. Este composto é um derivado benzofuroxano (*N*-óxido-benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol), que são compostos orgânicos, heterocíclicos que contém um grupamento *N*-óxido e um anel benzofuroxânico (GOSH et al., 1981). Estas moléculas têm sido bastante estudadas, uma vez que, são capazes de liberar EROs e ERNs, sendo o ON a principal espécie reativa gerada (JOVENÉ et al. 2013). Diversos estudos descrevem a atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral dos derivados benzofuroxanos (CERECETTO et al., 1999; BOIANI et al., 2008; JORGE et al., 2009; FARIAS et al., 2015).

A avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade *in vitro* compreendem uma importante fase no desenvolvimento de novos fármacos, pois permitem avaliar possíveis danos à viabilidade celular e ao DNA induzido pelo composto testado. Neste estudo (ARTIGO I) foi utilizado o teste cometa alcalino para avaliar dano no DNA, o teste de exclusão por azul de tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade celular e o teste de frequência de micronúcleos foi utilizado a fim de verificar uma possível ação mutagênica do composto EA2 (BARILE, 1994; TUCKER; PRESTON, 1996; BHATIA; KUMAR, 2013; ARALDI et al., 2015). Estas técnicas são internacionalmente aceitas como parte dos ensaios pré-clínicos, o que é recomendado por autoridades reguladoras internacionais (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009). Dessa forma, foi possível selecionar a concentração do composto EA2 que não induziu à danos na viabilidade celular, à danos no DNA e que não apresentou atividade mutagênica. Uma vez que, foram testadas três concentrações (10 µM/mL, 50 µM/mL e 100 µM/mL) e apesar de nenhuma das concentrações testadas terem induzido à mutagenicidade, apenas a menor concentração

apresentou-se segura, pois não provocou danos ao DNA das células e também não induziu à danos na viabilidade celular.

A citotoxicidade e genotoxicidade induzida pelas maiores concentrações do composto EA2, estão provavelmente ligadas à geração de EROs e ERNs, em especial o ON, uma vez que a porção *N*-óxido dos benzofuroxanos atua como um grupamento biorredutível, sendo responsável pela geração das espécies reativas (JOVENÉ et al., 2013). O ON é uma molécula capaz de modular reações inflamatórias ou anti-inflamatórias dependendo do estímulo e do tipo celular (MONCADA et al., 1991). Além disso, o ON tem sido descrito como crucial no controle da carga parasitária de animais infectados pelo *T. cruzi* e moléculas capazes de liberar ON em condições fisiológicas também mostram atividade leishmanicida (OLEA -AZAR et al., 2005; BOIANI et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2009; SANMARCO et al., 2016). Dessa forma, os derivados benzofuroxanos têm sido bastante estudados frente à diversos parasitos, uma vez que, dependendo da dose utilizada podem exercer atividade parasiticida, sem afetar as células do hospedeiro.

Sendo assim, a partir dos resultados descritos no primeiro artigo, foi realizado o experimento *in vitro* (ARTIGO II), no qual foi avaliada a atividade tripanocida do composto EA2 frente ao *T. cruzi*. Neste estudo o composto foi diluído em três diferentes concentrações (0,25%, 0,50% e 1%) e incubado por 72 h, a contagem das formas epimastigotas foi realizada a cada 24 h. Não foi observado crescimento das formas epimastigotas em nenhuma das concentrações testadas. A partir destes resultados, o teste *in vivo* (ARTIGO II) foi realizado. Neste experimento buscou-se avaliar a ação do composto EA2 frente ao *T. cruzi* e, também avaliar se o composto era capaz de proteger os animais das alterações hematológicas e bioquímicas induzidas pelo parasito, além de avaliar se o composto induzia a alterações no organismo dos animais sadios e tratados. Para isso, o composto EA2 foi administrado em três diferentes doses (10 mg/kg, 5 mg/kg e 2,5 mg/kg) e os animais divididos aleatoriamente em dez diferentes grupos.

O composto EA2 não apresentou eficácia curativa nos animais, no entanto, foi capaz de retardar o início da parasitemia, bem como, reduzir a contagem das formas tripomastigotas nos animais tratados com o composto em comparação ao grupo não tratado. As menores doses apresentaram melhores resultados em relação a maior dose testada, o que pode ser explicado pela liberação de ON, pois a produção desta molécula provavelmente foi maior nos grupos tratados com a maior dose, uma vez que, quando a produção do ON é exacerbada ele passa a exercer atividade pró-inflamatória e alguns autores relacionam o pico da parasitemia de *T. cruzi*

com quantidades elevadas de ON (MARTINS et al., 1998; ARANTES et al., 2004; RIBEIRO et al., 2007). Em relação aos parâmetros hematológicos, o tratamento com o composto em animais infectados não foi capaz de prevenir as alterações induzidas pelo parasito, exceto nos animais tratados com a dose de 5 mg/kg nos quais não houve alterações no hematócrito e na contagem de eritrócitos. Os animais sadios tratados com o composto não apresentaram alterações hematológicas em relação ao grupo controle.

Quanto ao perfil bioquímico dos animais, foi observado alterações na atividade sérica da ALT e AST, indicando desenvolvimento de lesão hepática nos animais infectados (LARANJA et al., 1948; PINTO et al., 2008; SANTOS et al., 2020; THRALL et al 2014). Os níveis séricos de albumina também encontraram-se alterados nos animais dos grupos infectados, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de lesão hepática ou pode ter ocorrido devido à inflamação, pois a albumina é uma proteína de fase aguda negativa e nestes casos, os níveis de proteínas plasmáticas encontram-se normais ou levemente reduzidos, como foi observado neste estudo (THRALL, 2014). Ureia e creatinina apresentaram-se alteradas apenas no grupo infectado e tratado com o Bz, o que indica que o tratamento com este medicamento induz à danos renais (CASTRO et al., 2006). Níveis séricos de ureia alterados também foram encontrados nos grupos infectados e tratados com 5 mg/kg do composto e no grupo infectado e tratado com DMSO a 4%, no entanto, alteração isolada dos níveis de ureia não é suficiente para afirmar que houve dano renal nos animais, uma vez que, quando há redução da taxa de filtração glomerular, ocorre o aumento tanto de ureia quanto de creatinina, dessa forma, o aumento de ureia nestes dois grupos pode ter ocorrido devido a hemorragia gastrointestinal, já que, este tipo de hemorragia é descrita em pacientes com a doença de Chagas (LARANJA et al., 1948). Não houve alteração no perfil bioquímico dos animais sadios tratados com o composto EA2 nas diferentes doses testadas.

5. CONCLUSÃO

A síntese do composto composto EA2 (5-((5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)carbamoil)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-*N*-óxido) foi realizada com sucesso. Através dos resultados obtidos no primeiro experimento (ARTIGO I) observamos que todas as concentrações testadas (10 µM/mL, 50 µM/mL e 100 µM/mL) *in vitro* frente a leucócitos humanos não induziram à mutagenicidade e que apenas a menor concentração (10 µM/mL) não induziu a danos na viabilidade celular nem ao DNA, mostrando-se a única concentração segura nestes testes.

O composto EA2 apresentou atividade tripanocida *in vitro* em todas as doses testadas (0,25%, 0,50% e 1%). No experimento *in vivo* não foi evidenciada eficácia curativa nos animais infectados e tratados, contudo, o mesmo foi capaz de retardar o início da parasitemia e reduzir significativamente a contagem de parasitos nos grupos tratados com as menores doses.

A dose de 5 mg/kg foi capaz de prevenir o desenvolvimento de anemia induzida pelo parasito e nenhuma das doses testadas impediu o desenvolvimento de alterações bioquímicas induzidas pelo *T. cruzi*. O composto EA2 não induziu a alterações na atividade sérica enzimas hepáticas e também não houve alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina nos animais não infectados e tratados. O tratamento com o composto não induziu a alterações hematológicas em animais sadios. Sendo assim, os resultados descritos nestes dois artigos são de grande importância e demonstram, o potencial do composto EA2 na terapêutica da doença de Chagas.

Como esta tese foi o primeiro trabalho desenvolvido com o referido composto, estudos adicionais devem ser realizados a fim de comprovar a segurança da terapia com o composto sintetizado, além disso, mais testes, avaliando diferentes doses, devem ser realizados, com o intuito de promover uma melhor resposta frente ao *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, G. BOIANI, L.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; PORCAL, W.; DENICOLA, A.; MÖLLER, M.; THOMSON, L.; TÓRTORA, V. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide Derivatives as Potential Antitrypanosomal Drugs. Part 3: Substituents-clustering Methodology in the Search for New Active Compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 23, 6324 – 6335, 2005.

ALBUQUERQUE, J.B., SANTOS, D. S., STEIN, J. V., MEIS, J, Oral Versus Intragastric Inoculation: Similar Pathways of Trypanosoma cruzi Experimental Infection? From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. *Frontiers in Immunology*, v. 9, P. 1-9, 2018.

ALEXANDRE, J. P. O., TESTON, A. P. M., ZANUSSO Jr, G. Tratamento etiológico da doença de chagas: Um antigo problema de saúde pública, *Revista UNINGÁ*, v. 20, n. 2, p. 91-96, 2014.

ALVEZ, D. F., MUNIZ, A. S. C., ABREL, C. D. R., FREITAS, N. R., TEIXEIRA, A. B., FERREIRA, E. S. Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. *Revista Brasileira de Análises clínicas*, v. 50, n. 4, p. 330-333, 2018.

ARALDI, R.P.; DE MELO, T.C.; MENDES, T.B.; DE SÁ JÚNIOR, P.L.; NOZIMA, B.H.; ITO, E.T. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 72, p. 74-82, 2015.

- ANGHEBEN, A., BOIX, L., BUONFRATE, D., GOBBI, F., BISOFFI, Z., PUPELLA, S., GANDINI, G., APRILI, G. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion*, v. 13, n. 4, p. 540-50, 2015.
- ANDRADE S.G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n.18, p.39-46, 1985.
- ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 100, p. 163-172, 1999.
- ANDRADE, J. P., MARIN NETO, J. A., De PAOLA, A. A. V., VILASBOAS, F., OLIVEIRA, G. M. M., BACAL, F., BOCCHI, A., ALMEIDA, D. R., FRAGATA FILHO, A. A., MOREIRA, M. C. V., XAVIER, S. S., OLIVEIRA Jr, W. A., DIAS, C. P. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Resumo Executivo. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 96, n. 6, 2011.
- ARANTES, R.M., MARCHE, H. H., BAHIA, M. T., CUNHA, F. Q., ROSSI, M. A., SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *The American Journal of Pathology*, n. 164, v. 4, p. 1361-68, 2004.
- BARILE, F.A. Introduction to In Vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods. 1st Edition. New York: CRC Press, 1994. 96p.
- BARREIRO, E. J. A Importância da Síntese de Fármacos na Produção de Medicamentos, *Química Nova*, v. 14, n. 3, p. 179-88, 1991.
- BERNARDES L. S. C.; KATO M. J.; ALBUQUERQUE S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 7075-7082, 2006.
- BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. *Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica*, v. 121, n. 7, p. 569-81, 2013.
- BOCK, M., GONERT, R., HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. *Boletim Chileno Parasitologia*, v. 24, n.1, p. 13-19, 1969.
- BOIANI, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; ORTIZ, S. T.; SERNA, E.; BILBAO, N. V.; SANABRIA, L.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R.; VEJA, C.; ROLAN, M.; GÓMEZBARRIO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. *Journal Medicine Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 3215-24, 2006.
- BOIANI, L., AGUIRRE, G., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., CHIDICHIMO, A., CAZZULO, J.J., BERTINARIA, M., GUGLIELMO, S. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as antitrypanosomatid agents: mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 7900-7, 2008.

- BOSQUESI, P. L. Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos potencialmente antichagásicos. 2013. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.
- BRAMBILLA, G., MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents, *Mutation Research*, v. 612, n. 2, p. 115-49, 2009.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.
- BURLEIGH, B.A., WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology*, v.4, n.11, p.701-711, 2002.
- BUSCAGLIA, C. A., DI NOIA, J. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 419-427, 2003.
- CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas Disease Cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 331-335, 1999.
- CANÇADO, J. R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzimidazole. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. p.389-405.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benzimidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.
- CARLIER Y, TORRICO F, SOSA-ESTANI S, RUSSOMANDO G, LUQUETTI A, FREILIJ H, VINAS, P. A. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011 v. 5, n. 10, p. 1-3, 2011.
- CASTILLO-RIQUELME, M., GUHL, F., TURRIAGO, B., PINTO, N., ROSAS, F., MARTÍNEZ, M, F., FOX-RUSHBY, J., DAVIES, C., CAMPBELL-LENDRUM, D. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n.11, p. 1-11, 2008.
- CASTRO, J. A. et al. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, n. 6, p. 471-479, 2006.
- CASTRO, D., BOIANI, L., BENITEZ, D., HERNÁNDEZ, P., MERLINO, A., GIL, C., OLEA-AZAR, C., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., PORCAL, W. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 12, p. 5055-65, 2009.
- CERECETTO, H., Di MAIO, R., GONZÁLEZ, RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole *N*-Oxide

Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure-Activity Relationships. *Journal Medicine Chemistry*, v. 42, p. 1941-50, 1999.

CERECETTO, H., PORCAL, W. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 57-71, 2005.

CERQUEIRA, N. F., YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico revisão, *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, 417-423, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. 1909.

CHEN, L. ZHANG, Y., KONG, X., LAN, E., HUANG, Z., PENG, S., KAUFMAN, D. L., TIAN, J. Design, synthesis, and antihepatocellular carcinoma activity of nitric oxide releasing derivatives of oleanolic acid. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, v. 51, n. 15, p. 4834-4838, 2008.

CHIARI, E., GALVÃO, L. M. C. Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. Editora. Fiocruz, 1997. In: DIAS, JCP., and COURA, JR., org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 85-97

CHOCAIR, R. P., SABBAGA, E., AMATO NETO, V., SHIROMA, M., GOES, G. M. Kidney transplantation: a new way of Chagas' disease transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 23, n. 6, p. 280-82, 1981.

CHUGUNOVA, E., BOGA, C., SAZYKIN, I., CINO, S., MICHELETTI, G., MAZZANTI, A., SAZYKINA, M., BURILOV, A., KHMELEVTSOVA, L., KOSTINA, N. Synthesis and antimicrobial activity of novel structural hybrids of benzofuroxan and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 93, p.349–359, 2015.

COURA, J. R., ABREU, L. L., WILLCOX, H. P. F., PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. Avaliação preliminar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30: 139-144, 1997

COURA, JR.; de CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002

COURA, J. R., DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 104, p. 31-40, 2009.

CROFT, S. L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 94, n. 2, p. 215-220, 1999

DA NÓBREGA, A. A., DE ARAÚJO, W. N., VASCONCELOS, A. M. N. Mortality due to chagas disease in Brazil according to a specific cause. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, n. 3, p. 528-533, 2014.

- De PONTES, V. M. O., SOUZA Jr, A. S., Da CRUZ, f. M. T., COELHO, L. L., DIAS, A. T. N., COELHO, I. C. B., OLIVEIRA, M. F., Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 2, p. 182-187, 2010
- DEVERA, R., ILLARRAMENDI, X., MONTOYA-ARAÚJO, R. PIRMEZ, C., FERNANDEZ, O., COURA, J. R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, 323-330, 2002.
- DEWANGAN, D. PANDEY, A., SIVAKUMAR, T., RAJAVEL, R., DUBEY, R. D. Synthesis of some Novel 2, 5- Disubstituted 1, 3, 4-Oxadiazole and its Analgesic, Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Tubercular Activity. *International Journal of ChemTech Research*, v. 2, n. 3, p. 1397-1412, 2010.
- DIAS, J. C. P., SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 31, n. 4, p. 373-83, 1998.
- DIAS, J. C. P., MACÊDO, V. O. Doença de Chagas 2005. *In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 557-594.*
- DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, n. 10, p. 2020-2021, 2006.
- DIAS, L. C., DESSOY, M. A., SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A. D. 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.; AMATO NETO, V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 68-72, 2011.
- DIAS, J. C. P., AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 98-72, 2011.
- DIAS, J. C. P., RAMOS Jr, A. N., GONTIJO, E. D., LUQUETTI, A., SHIKNAI-YASUDA, M. A., COURA, J. R., TORRES, R. M., MELO, J. R. C., ALMEIDA, E. A., OLIVEIRA Jr, W., SILVEIRA, A. C., REZENDE, J. M., PINTO, F. S., FERREIRA, A. W., RASSI, A., FILHO, A. A. F., SOUSA, A. S., CORREIA FILHO, D., JANSEN, A. M., ANDRADE, G. M. Q., CARVALHO, C. F. P., PINTO, A. Y. N., RASSI Jr, A., CAMPOS, D. E., ABAD-FRANCH, F., SANTOS, E. E., CHIARI, E., HASSLOCHER-MORENO, A., MOREIRA, E. F., MARQUES, D. S. O., SILVA, E. L., MARIN-NETO, J. A., GALVÃO, L.M. C., XAVIER, S. S., VALENTE, S. A. S., CARVALHO, N. B., CARDOSO, A. V., SILVA, R. A., COSTA, V. M., VIVALDINI, S. M., OLIVEIRA, S. M., VALENTE, V. C., LIMA, M. M., ALVES, R. V. II Consenso Brasileiro de doença de Chagas, 2015. *Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, p. 7-26, 2016.

DÍAZ DE, TORANZO E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE, D.E.; CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J. Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DOCAMPO, R, MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agent and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Reviews of infectious diseases*, v. 6, n. 2, p. 223-238, 1984.

DUTRA, L.A., DE ALMEIDA, L., PASSALACQUA, T.G., REIS, J.S., TORRES, F.A., MARTINEZ, I., PECCININI, R.G., CHIN, C.M., CHEGAEV, K., GUGLIELMO, S., FRUTTERO, R., GRAMINHA, M.A., DOS SANTOS, J.L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 8, p.4837-47, 2014

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Assessing the burden of key infectious diseases affecting migrant populations in the EU/EEA: technical report. Stockholm: ECDC; 2014.

FARIAS, C. F., MASSAOKA, H., GIROLA, N., AZEVEDO, R. A., FERREIRA, A. K., JORGE, S. D., TAVARES, L. C., FIGUEIREDO, C. R., TRAVASSOS, L. R. Benzofuroxan derivatives N-Br and N-I induce intrinsic apoptosis in melanoma cells by regulating AKT/BIM signaling and display anti metastatic activity in vivo. *BMC Cancer.*, v. 15, n. 807, 2015.

GALVAO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, v. 202, p. 1-36, 2003.

GALVAO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 291 p.

GONTIJO, E. D.; SANTOS, S. E. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=173>>. Acesso em: 06 abr. 2020.

GHOSH, P., TERNAL, B., WHITEHOUSE, M. Benzofurazans and Benzofuroxans: Biochemical and Pharmacological Properties. *Medicinal Research Reviews*. V. 1, n. 2, p. 159-187, 1981.

GRUNBERG E., BESKIND G., GREELAND R. Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazol derivatives. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 7, p. 513-519, 1967.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 236-245, 2009.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazones derivatives as

hits for the development of neglected diseases drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, p. 64–74, 2013.

JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, L.L.; MOSS, D.W.; HOLMES, L.S.; BAYLIS, S.A.; RHODES, P.; WESTMORE, K.; EMSON, P.C.; MONCADA, S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 10, p. 4392-4396, 1995.

JORGE, S.D.; MASUNARI, A.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PASQUALOTO, K.F.M.; TAVARES, L.C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, 3028–3036, 2009.

JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; PASQUALOTO, K. F. M.; ISHII, M.; FERREIRA, A. C.; BERRA, C. M.; BOSCH, R. V.; MARIA, D. A.; TAVARES, L. C. Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as *antiTrypanosoma cruzi* agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 64, p. 200-214, 2013.

JOVENÉ, C., CHUGUNOVA, E.A., GOUMONT, R. The properties and the use of substituted benzofuroxans in pharmaceutical and medicinal chemistry: a comprehensive review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. v. 18, n. 8, p. 1089-136, 2013.

KOROLKOVAS, A. Dicionário terapêutico guanabara. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 644 p.

LAFEPE, BENZNIDAZOL: benznidazol. Recife, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco S/A – LAFEPE. Bula de medicamento.

LARANJA, F. S., DIAS, E., NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.

MARTINS, G. A., CARDOSO, M.A., ALIBERTI, J. C., SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* v. 63, n. 2, p. 113-20, 1998.

MARTINS, A. V. et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infection*, v. 16, n. 1, p. 45–58, 2012.

MELO, J. O.F. Heterociclos 1,2,3- triazólicos: Histórico, Métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v.29, n.3, p. 569 – 579, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. Informe Técnico. *Revista de Patologia Tropical*, v. 42, n. 4, p. 475-478, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, v. 3, 1ª edição, Brasília, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, v. único, 3ª edição, Brasília, 2019.

- MOLINA, I., PRAT, J. G., SALVADOR, F., TREVIÑO, B., SULLEIRO, E., SERRE, N., POU, D., ROURE, S., CABEZOS, J., VALERIO, L., BLANCO-GRAU, A., SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A., VIDAL, X., PAHISSA, A. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 20, 1899-1908, 2014.
- MONTEIRO, S. G. Parasitologia na Medicina Veterinária. 2ª edição, São Paulo: Roca, 2017, 370 p.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p. 109-42, 1991.
- MORETTI, E., BASSO, B., CASTRO, I., PAEZ, M. C., CHAUL, M., BARBIERI, G., FEIJOO, C., SARTORI, J., PAEZ, R. C. Chaga's disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, n. 1, p. 53-5, 2005.
- MORAES-SOUZA, H., FERREIRA-SILVA, M. M. Controle da transmissão transfusional. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p.64-7, 2011.
- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 12 ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2011.
- OLEA-AZAR, C.; RIGOL, C.; MENDIZÁBAL, F.; BRIONES, R.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; RISSO, M.; GONZÁLEZ, M.; PORCAL, W. Electrochemical and microsomal production of free radicals from 1,2,5-oxadiazole N-oxide as potential antiprotozoal drugs. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 59, n. 1, p. 69-74, 2003.
- OLIVEIRA, M. F.; NAGÃO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA, J. A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. v. 37, n. 3, p. 2009-228. 2008.
- PASSOS, L. A. C. GUARALDO, A. M. A., BARBOSA, R. L., DIAS, V. L., PEREIRA, K., SCHIMIDT, L F., FRANCO, R. M. B., ALVES, D. P. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 21, n. 2. p. 223-232, 2012.
- PERINETTI, L., MARTINS, A., CASTANHO, R. E. P., ROSA, J. A., SILVA, L. C., GODOY, C. A. P., ROSA, R. M. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 35-39, 2003.
- PETERSON, F.J.; MASON, RP.; HOVSEPIAN, J.; HOLTZMAN, J.L. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 254, n. 10, p. 4009-4014, 1979.
- PINAZO MJ, MIRANDA B, RODRÍGUEZ-VILLAR C, ALTCLAS J, BRUNET SERRA M, GARCÍA-OTERO EC, ALMEIDA, E. A., GARCIA, M. I. M., GASCON, J., RODRÍDREZ, M. G., MANITO, N., CAMACHO, A. M., OPPENHEIMER, F., PUENTE, S. P., RIARTE,

- A., CORONAS, J. S., LLETÍ, M. S., SANZ, G. F., TORRICO, F., TENDERO, D. T., USSET, P., SHIKANAI-YASUDA, M. A. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. *Transplantation Reviews*, v. 25, n. 3, p. 91-101, 2011.
- PINTO, A. Y. N., VALENTE, S. A., VALENTE, V. C., FERREIRA Jr, A. G., COURA, J. R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 6, p.602-14, 2008.
- PONTES, V. M. O., JÚNIOR, A. S. S., CRUZ, F. M. T., COELHO, H. L. L., DIAS, A. T. M., COELHO ICB, OLIVEIRA MF. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estados do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 2, p. 182-187, 2010.
- PORTELA-LINDOSO, A. A. B., SHIKANI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase, *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 1, p. 107-15, 2003.
- PRATA, A., MACÊDO, V., PORTO, G., SANTOS, I., CERISOLA, J. A., SILVA, N. Tratamento da doença de Chagas pelo Nifurtimox (Bayer 2502). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 9, p. 297-307, 1975
- RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- REICHE, E. M., INOUYEL, M.M., BONAMETTI, A. M., JANKEVICIUS, J. V. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. *Jornal de Pediatria*. v. 72, n. 3, p. 125-32, 1996.
- REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 424 p.
- RIBEIRO, D., CALVI, S. A., PICKA, M. M., PERSI, E., CARVALHO, T. B., CAETANO, P.K., NAGOSHI, R. L., LIMA, C. R. G., MACHADO, J. M., SALVADORI, D. M. F. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 116, n. 3, p. 296-301, 2007.
- RIBEIRO, D., CALVI, S. A., PICKA, M. M., PERSI, E., CARVALHO, T. B., CAETANO, P.K., NAGOSHI, R. L., LIMA, C. R. G., MACHADO, J. M., SALVADORI, D. M. F. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 116, n. 3, p. 296-301, 2007.
- SANMARCO, L. M., VISCONTI, L. M., EBERHARDT, RAMELLO, R. C., PONCE, N. E., SPITALE, N. B., VOZZA, M. L., BERNARDI, G. A., GEA, S., MINGUEZ, A. R., AOKI, M. P. IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*. v., 7, p. 1-12, 2016.
- SANTOS, V. R. C., ANTUNES, D., SOUZA, D. S. M., MOREIRA, O. C., LIMA, I. C. A., FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A., LOBO, J. P., MEIS, E., COURA, J. R., SAVINO, W., JUNQUEIRA, V., MEIS, J. Human acute Chagas disease: changes in factor VII, activated

protein C and hepatic enzymes from patients of oral outbreaks in Pará State (Brazilian Amazon). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, p.1-6, 2020.

SCHUMINIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, v. 31, n. 6, p.547- 57, 1991.

SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico, In: Doença de Chagas Aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013, v. 46, n. 21, 2015.

SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico. Número especial. Doença de Chagas, 2020.

SCHIEFER, I.T.; VANDEVREDE, L.; FA', M.; ARANCIO, O.; THATCHER, G.R. Furoxans (1,2,5-oxadiazole-N-oxides) as novel NO mimetic neuroprotective and procognitive agents. *Journal Medicinal Of Chemistry*. v. 55, p. 3076-87, 2012.

SILVEIRA, A. C.; FEITOSA, V. R.; BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83 *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais.*, v.36, p.15-312, 1984.

SILVA-DOS-SANTOS, J. B., GUERRA, B., MOREIRA, O. C., BERBET, L. R., RAMOS, M. T., MASCARENHAS, B. A., BRITTO, C., MORROT, A., VILLA-VERDE, D. M. S., GARZONI, L. R., SAVINO, W., COTTA-de-ALMEIDA, V., MEIS, J. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.11, n.4, p.1-26, 2017.

SOUZA, D. S. M.; POVOA, R. M. S. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Doença de Chagas Aguda no Brasil e na América Latina. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 26, n. 4, p. 222-229, 2016.

THRALL, M. A., WEISER, G., ALLISON, R. W., CAMPBELL, T. W. 2a Edição. Rio de Janeiro: Roca LTDA., 2014. 688 p.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYREBC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental parasitology*, v.114, p.279- 288, 2006.

TUCKER, J. D., PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research* v. 365, n. 1, p. 147–159, 1996.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, v.1, p.472-81, 2001.

URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 349-355, 1999.

URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas Disease. *Current pharmaceutical Design*, v. 8, n.4, p. 287-295, 2002.

VENTURINI, G., SALVATI, L., MUOLO, M., COLASANTI, M., GRADONI, L., ASCENI, P. Nitric Oxide Inhibits Cruzipain, the Major Papain-like Cysteine Proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 270, n. 1, p. 437-41, 2000.

VERGARA, C., MUÑOZ, MARTINEZ, APT, W., ZULANTAY, I. Detection of *Trypanosoma cruzi* by PCR in adults with chronic Chagas disease treated with nifurtimox. *Plos One*, v. 14, n. 8, p. 1-7, 2019.

WILKINSON, S.R. TAYLOR, M. C., HORN, D., KELLY, J. M., CHESEEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.