



HÍBRIDOS DE METRONIDAZOL E EUGENOL ATENUAM A INFECÇÃO E O DANO CARDÍACO NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Elda G. S. e Leite¹; Abner V. G. dos Santos¹; Monique D. Benedetti²; Graziela D. A. Lima¹, Lucas L. Franco²; Juliana S. Maciel²; Ivo S. Caldas³; Rômulo D. Novaes¹

¹Departamento de Biologia Estrutural, Universidade Federal de Alfenas

²Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas

³Departamento de Patologia e Parasitologia, Universidade Federal de Alfenas

elda.santos@sou.unifal-mg.edu.br

Palavras-Chave: Quimioterapia experimental, *Trypanosoma cruzi*, miocardite.

Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, permanece como uma doença tropical negligenciada e um importante problema de saúde pública mundial, acometendo aproximadamente 7 milhões de pessoas e sendo responsável por cerca de 50 mil mortes anuais (WHO, 2022). Inicialmente restrita à América Latina, a doença adquiriu dimensão global em decorrência dos fluxos migratórios, representando atualmente um importante desafio sanitário também em países não endêmicos (CONNERS et al., 2016; LIDANI et al., 2019; ANTINORI et al., 2017). Além do elevado impacto social, a doença gera um ônus econômico superior a US\$ 7,2 bilhões por ano, principalmente em decorrência das complicações cardíacas e dos custos relacionados ao tratamento de pacientes em estágios avançados da infecção (CONNERS et al., 2016; LIDANI et al., 2019).

A evolução clínica da doença compreende uma fase aguda, geralmente oligossintomática, seguida por uma fase crônica, na qual cerca de 30–40% dos indivíduos desenvolvem a forma cardíaca, considerada a manifestação clínica mais frequente e grave da doença. A cardiomiopatia chagásica crônica caracteriza-se por inflamação persistente, estresse oxidativo, remodelamento cardíaco, arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita, constituindo a principal causa de morbimortalidade associada à infecção por *T. cruzi* (RASSI et al., 2017; CALDAS et al., 2019; CHAO et al., 2020). Embora o diagnóstico precoce e o tratamento sejam fundamentais para reduzir a progressão da doença, a terapia etiológica permanece limitada ao benznidazol e ao nifurtimox, fármacos associados à elevada toxicidade, baixa eficácia na fase crônica e resposta variável entre diferentes cepas do parasito, evidenciando a necessidade urgente do desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2021; CALDAS et al., 2019; ZUMA; SOUZA, 2021).

Nesse contexto, compostos nitroimidazólicos apresentam reconhecidas propriedades antiparasitárias e imunomoduladoras (Kapoor et al., 2003), enquanto o eugenol possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária amplamente



descritas (KOTHARI et al., 2004). A estratégia de hibridação molecular dessas duas plataformas químicas representa uma abordagem promissora para a obtenção de candidatos com múltiplos mecanismos de ação, capazes de potencializar a atividade antiparasitária e reduzir o dano tecidual associado à infecção. Assim, foram sintetizados dois novos híbridos moleculares derivados de metronidazol e eugenol (AD06 e AD07), com o objetivo de avaliar sua atividade antiparasitária, seus efeitos sobre o estresse oxidativo e a inflamação, bem como seu potencial cardioprotetor em modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção experimental por *T. cruzi*.

Material e Métodos

Os híbridos moleculares AD06 e AD07, derivados de metronidazol-eugenol e metronidazol-diidroeugenol, respectivamente, foram sintetizados conforme protocolo previamente descrito por Pelozo et al. (2021) e caracterizados por espectroscopia no infravermelho (IV) e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C . O benznidazol foi utilizado como fármaco de referência. Nos ensaios *in vitro*, empregou-se a cepa Y (DTU II) de *T. cruzi*, parcialmente resistente ao benznidazol (Diniz et al., 2018), e cardiomiócitos H9c2 cultivados em DMEM suplementado, conforme descrito por Tardieux et al. (1992), Petersen e Burleigh (2003) e Gonçalves-Santos et al. (2019).

A citotoxicidade dos híbridos em cardiomiócitos e a atividade antiparasitária sobre formas epimastigotas e tripomastigotas foram determinadas por ensaios de viabilidade celular utilizando resazurina ou contagem em câmara de Neubauer, permitindo o cálculo dos valores de CC_{50} e IC_{50} (BRANCAGLION et al., 2018; GONÇALVES-SANTOS et al., 2019; MAZZETI et al., 2019). O efeito sobre o parasitismo intracelular foi avaliado em cardiomiócitos infectados, utilizando o índice endocítico após coloração por Giemsa (SOUZA-SILVA et al., 2020). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), superóxido mitocondrial e peróxido de hidrogênio foi quantificada por fluorimetria e espectrofotometria utilizando kits comerciais. A atividade da enzima tripanotona reductase foi determinada por método colorimétrico descrito por van den Bogaart et al. (2014), enquanto a troponina I cardíaca foi quantificada por ELISA como marcador de dano microestrutural (BONNEY et al., 2013).

Nos ensaios *in vivo*, camundongos *Swiss* fêmeas foram infectados com 5×10^3 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e tratados durante sete dias com benznidazol, AD06 ou AD07 (100 mg/kg), conforme Filardi e Brener (1987). A parasitemia foi monitorada diariamente pelo método de Brener (1962), sendo determinados o pico, a parasitemia média e a área sob a curva (NOVAES et al., 2017). Ao final do experimento, foram avaliados marcadores plasmáticos de hepatotoxicidade (AST e ALT), níveis de IgG anti-*T. cruzi* por ELISA (Voller et al., 1976; Vilas-Boas et al., 2022) e alterações histopatológicas cardíacas por coloração em hematoxilina-eosina (SEQUETTO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2017; NOVAES et al., 2018). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 59/2017). Os dados foram expressos como média $\pm$

desvio-padrão e analisados quanto à normalidade pelo teste de D'Agostino-Pearson. Comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis, seguidos dos testes *pós-hoc* apropriados, adotando-se $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Os híbridos AD06 e AD07 apresentaram atividade antiparasitária frente às formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, exibindo maior potência que o metronidazol e citotoxicidade significativamente inferior ao benznidazol em cardiomiócitos H9c2. Os dois híbridos apresentaram menores valores de IC_{50} para ambas as formas parasitárias e maiores índices de seletividade, indicando que a estratégia de hibridação molecular entre metronidazol e derivados do eugenol potencializou a atividade tripanocida sem comprometer a segurança celular, conforme demonstrado na tabela 1. Esses resultados corroboram estudos que demonstram que a associação de diferentes farmacóforos em uma mesma molécula pode resultar em compostos com maior eficácia biológica e melhor perfil farmacológico (PELOZO et al., 2021).

Tabela 1. Potencial antiparasitário, citotóxico e seletivo de híbridos de metronidazol em comparação ao benznidazol sobre *Trypanosoma cruzi* e cardiomiócitos *in vitro*.

	IC_{50} Epi.($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} Tryp.($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SI Epi.	SI Tryp.
Benznidazole	5.06 $\pm$ 0.08	1.34 $\pm$ 0.01	>200	39.50	149.00
Metronidazole	32.81 $\pm$ 1.33	30.83 $\pm$ 5.42	133.95 $\pm$ 10.25	4.08	4.34
Eugenol	10.20 $\pm$ 3.07	45.03 $\pm$ 4.34	41.32 $\pm$ 12.71	4.05	0.91
Dihydroeugenol	3.32 $\pm$ 0.73	1.95 $\pm$ 0.18	14.19 $\pm$ 9.40	4.27	7.27
AD06	11.58 $\pm$ 0.57	2.57 $\pm$ 0.34	149.90 $\pm$ 18.70	12.94	58.13
AD07	9.49 $\pm$ 0.55	2.66 $\pm$ 0.07	108.87 $\pm$ 8.77	11.47	40.92

AD06: Híbrido de metronidazol conjugado ao eugenol e nitrado na posição meta em relação ao grupo hidroxila.

AD07: Híbrido de metronidazol conjugado ao di-hidroeuogenol e nitrado na posição orto em relação ao grupo hidroxila.

IC_{50} : concentração inibitória média capaz de inibir 50% das diferentes formas parasitárias.

CC_{50} : concentração citotóxica média capaz de reduzir em 50% a viabilidade de cardiomiócitos H9c2.

SI: índice de seletividade.

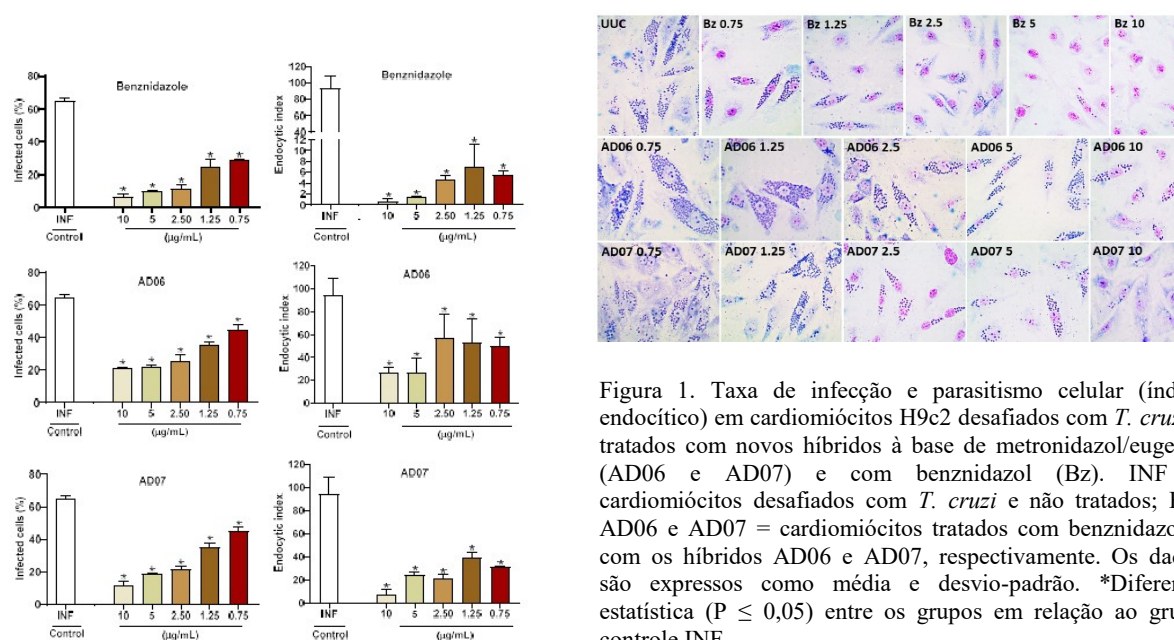
Epi: epimastigotas.

Tryp: tripomastigotas.

Os valores de IC_{50} e CC_{50} são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão.

A avaliação do parasitismo intracelular revelou que ambos os híbridos reduziram significativamente a infecção de cardiomiócitos H9c2 por *T. cruzi* de maneira concentração-

dependente (Fig. 1). O AD07 promoveu as maiores reduções no número de células infectadas, na quantidade de amastigotas intracelulares e, conseqüentemente, no índice endocítico, alcançando efeito semelhante ao observado com o benznidazol nas maiores concentrações testadas. A diminuição da carga parasitária intracelular é particularmente relevante, uma vez que a permanência do parasito nos tecidos constitui um dos principais fatores associados à manutenção da resposta inflamatória e à progressão da cardiomiopatia chagásica crônica (BONNEY; ENGMAN, 2008).



A infecção por *T. cruzi* promoveu intenso aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), superóxido mitocondrial e peróxido de hidrogênio em cardiomiócitos infectados. O tratamento com AD07 reduziu significativamente esses marcadores oxidativos em todas as concentrações avaliadas, apresentando desempenho semelhante ao benznidazol, enquanto AD06 exerceu efeito antioxidante mais discreto, restrito às maiores concentrações (Fig. 2). A redução das ERO provavelmente decorre da menor carga parasitária intracelular associada ao conhecido potencial antioxidante dos derivados fenólicos do eugenol, capazes de sequestrar radicais livres e limitar danos oxidativos celulares (KORKMAZ et al., 2021; KOTHARI et al., 2010). Esses achados são particularmente relevantes, considerando que o estresse oxidativo desempenha papel central na disfunção mitocondrial, morte celular e remodelamento cardíaco observados durante a doença de Chagas (WEN et al., 2018; DHIMAN; GARG, 2011).

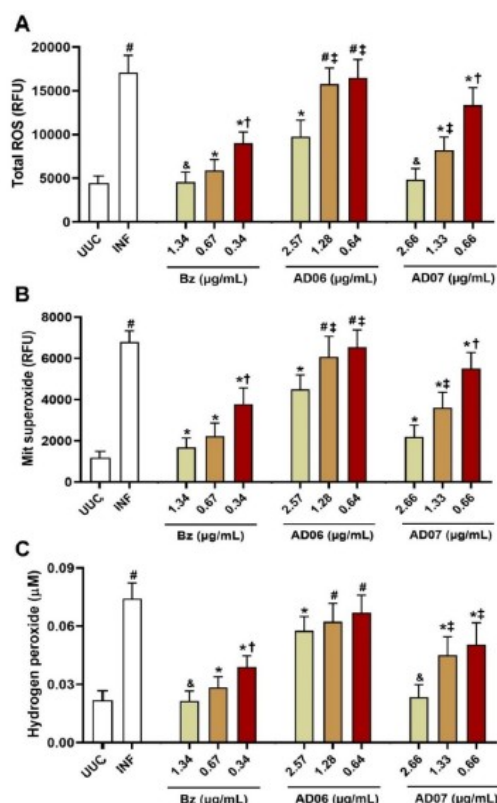


Figura 2. Produção total de espécies reativas de oxigênio (EROs - A), superóxido mitocondrial (B) e peróxido de hidrogênio (C) em cardiomiócitos H9c2 desafiados com *T. cruzi* e tratados com novos híbridos à base de metronidazol/eugenol (AD06 e AD07) e com benznidazol (Bz). Grupos: UUC = cardiomiócitos não infectados e não tratados; INF = cardiomiócitos não tratados e desafiados com *T. cruzi*; AD06 e AD07 = cardiomiócitos tratados com AD06 e AD07 nas concentrações de 100%, 50% e 25% da IC₅₀ para *T. cruzi* e desafiados com esse parasita. Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes fármacos em comparação com: * UUC e INF; & INF; # UUC; † Bz 1,34 / 0,67, AD06 2,57 / 1,28 e AD07 2,66 / 1,33; ‡ Bz 1,34, AD06 2,57 e AD07 2,66.

Além da modulação do ambiente oxidativo da célula hospedeira, os híbridos interferiram diretamente na homeostase redox do parasito. Tanto AD06 quanto AD07 reduziram significativamente a atividade da tripanotona redutase, sendo o efeito mais pronunciado para AD07, enquanto o benznidazol não promoveu inibição significativa dessa enzima (Fig. 3). A tripanotona redutase constitui um alvo farmacológico altamente atrativo por ser essencial para a manutenção do sistema antioxidante exclusivo dos tripanossomatídeos, protegendo o parasito contra espécies reativas produzidas durante a infecção. Dessa forma, sua inibição aumenta a susceptibilidade do *T. cruzi* ao estresse oxidativo e potencializa a atividade tripanocida (FAIRLAMB; CERAMI, 1992; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). Esses resultados sugerem que os híbridos atuam por mecanismo complementar ao do benznidazol, ampliando as possibilidades para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

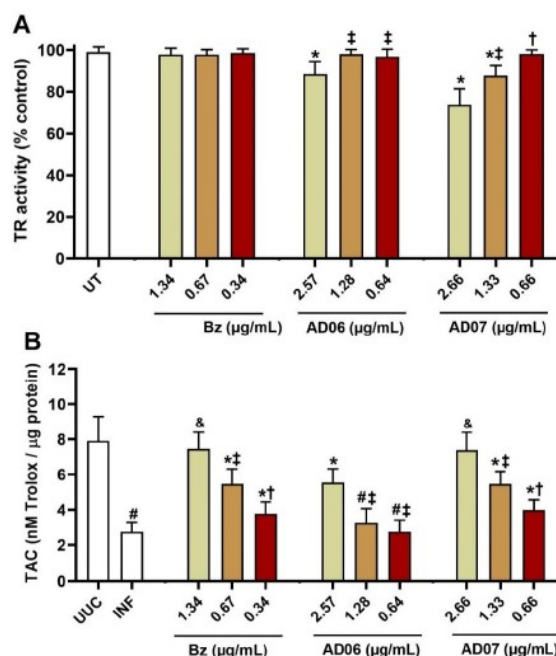


Figura 3. Atividade da tripanotona redutase em *T. cruzi* (A) e capacidade antioxidante total em cardiomiócitos H9c2 desafiados com *T. cruzi* (B) tratados com novos híbridos à base de metronidazol/eugenol (AD06 e AD07) e benznidazol (Bz). Grupos: UT = parasitos não tratados; UUC = cardiomiócitos não infectados e não tratados; INF = cardiomiócitos não tratados desafiados com *T. cruzi*; AD06 e AD07 = AD06 e AD07 administrados a 100%, 50% e 25% da CI50 calculada para *T. cruzi*. Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes fármacos em comparação com *UT, UUC e INF; ‡ Bz 1,34, AD06 2,57 e AD07 2,66; † Bz 1,34 / 0,67, AD06 2,57 / 1,28 e AD07 2,66 / 1,33; & INF; # UUC.

O dano microestrutural aos cardiomiócitos foi avaliado pela quantificação de troponina I cardíaca (cTnI), biomarcador amplamente empregado para detectar lesão miocárdica. A infecção por *T. cruzi* elevou significativamente os níveis de cTnI no sobrenadante das culturas celulares, enquanto o tratamento com AD07 promoveu redução significativa desse marcador em todas as concentrações avaliadas, apresentando efeito comparável ao benznidazol. O AD06 também reduziu a liberação de cTnI, porém de forma menos intensa (Fig. 4). Considerando que o aumento de troponina I está associado à lesão de cardiomiócitos durante a fase aguda da infecção chagásica (Bonney et al., 2013), esses resultados reforçam que o AD07 exerce importante efeito cardioprotetor, provavelmente decorrente da combinação entre sua atividade antiparasitária e a redução do estresse oxidativo induzido pela infecção.

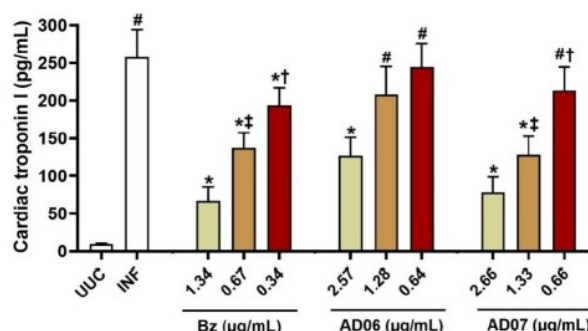


Figura 4. Níveis de troponina I cardíaca em cardiomiócitos H9c2 desafiados com *T. cruzi* e tratados com novos híbridos à base de metronidazol/eugenol (AD06 e AD07) e benznidazol (Bz). Grupos: UUC = cardiomiócitos não infectados e não tratados; INF = cardiomiócitos não tratados e desafiados com *T. cruzi*; AD06 e AD07 = cardiomiócitos tratados com AD06 e AD07 nas concentrações de 100%, 50% e 25% da CI50 para *T. cruzi* e desafiados com esse parasita. Os dados são expressos como média e desvio-padrão. Diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os diferentes fármacos em comparação com *UUC e INF; # UUC; † Bz 1,34 / 0,67, AD06 2,57 / 1,28 e AD07 2,66 / 1,33; ‡ Bz 1,34, AD06 2,57 e AD07 2,66.

Nos ensaios *in vivo*, todos os animais infectados desenvolveram parasitemia, confirmando o estabelecimento da infecção experimental. Entretanto, o tratamento com AD07 reduziu significativamente o pico de parasitemia, a parasitemia média e a área sob a curva parasitêmica, apresentando efeito semelhante ao benznidazol, enquanto AD06 promoveu resposta mais discreta (Fig. 5). A menor carga parasitária observada com AD07 confirma os resultados *in vitro*, demonstrando que sua atividade tripanocida é mantida em um sistema biológico complexo e sugerindo adequada biodisponibilidade do composto (FILARDI; BRENER, 1987; NOVAES et al., 2017). Além disso, nenhum tratamento promoveu mortalidade, indicando boa tolerabilidade.

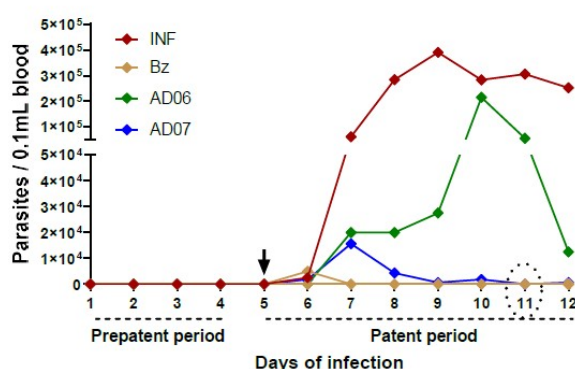


Figura 5. Curva de parasitemia obtida de camundongos infectados por *T. cruzi* e tratados com novos híbridos à base de metronidazol/eugenol (AD06 e AD07) e com benznidazol (Bz). INF: infectados e não tratados (n=10); Bz: infectados e tratados com 100 mg/kg de benznidazol (n=8); AD06: infectados e tratados com 100 mg/kg de AD06 (n=8); AD07: infectados e tratados com 100 mg/kg de AD07 (n=8). As linhas representam a variação da parasitemia sanguínea média observada em todos os grupos experimentais durante o período do experimento. O tratamento foi administrado diariamente por via oral durante sete dias consecutivos (5 a 11). Seta: confirmação da infecção e início do tratamento (dia 5). Elipse pontilhada: último dia de tratamento (dia 11).

A avaliação da segurança demonstrou que AD06 e AD07 não induziram hepatotoxicidade. Os níveis plasmáticos de AST e ALT permaneceram semelhantes aos observados nos animais tratados com benznidazol, indicando ausência de dano hepático adicional (Fig. 6). Esse achado é particularmente relevante, considerando que a toxicidade sistêmica constitui uma das principais limitações da terapêutica atualmente disponível para a doença de Chagas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; ZUMA; SOUZA, 2021). A análise da resposta humoral revelou aumento de IgG total e das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b em todos os grupos infectados, sem diferenças entre animais tratados e não tratados. Esses resultados indicam que os híbridos preservaram a resposta imune específica contra *T. cruzi*, sugerindo que a redução da parasitemia decorreu da ação antiparasitária direta dos compostos, e não de imunossupressão (VOLLER et al., 1976; VILAS-BOAS et al., 2022).

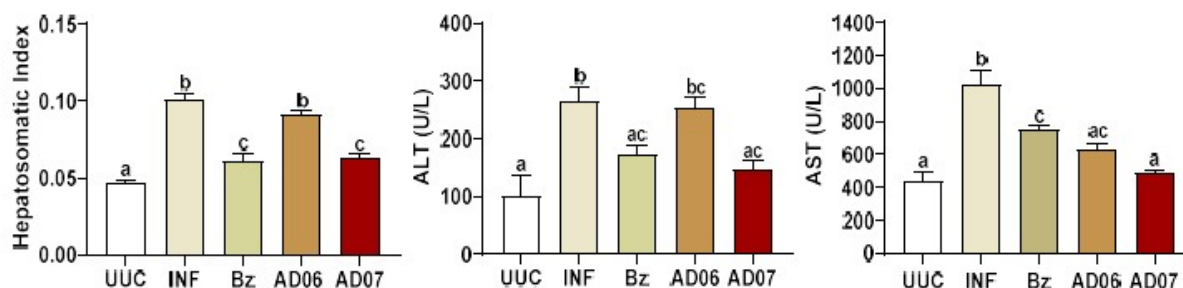


Figura 6. Índice hepatossomático e níveis plasmáticos de enzimas indicadoras de função hepática em camundongos controle não infectados e infectados por *T. cruzi*, tratados com novos híbridos à base de metronidazol/eugenol (AD06 e AD07) e com benznidazol (Bz). UUC: Controle não infectado e não tratado (n=10); INF: Infectado e não tratado (n=8); Bz: Infectado e tratado com 100 mg/kg de benznidazol (n=8); AD06: Infectado e tratado com 100 mg/kg de AD06 (n=8); AD07: Infectado e tratado com 100 mg/kg de AD07 (n=8). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. a, b, c: Grupos marcados com letras diferentes apresentam diferença estatística ($P < 0,05$), e grupos que compartilham alguma letra não apresentam diferença estatística ($P > 0,05$), segundo a análise de variância de Kruskal-Wallis por postos (One Way Analysis of Variance on Ranks) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

A análise histopatológica confirmou intenso infiltrado inflamatório cardíaco nos animais infectados (Fig. 7). O tratamento com AD07 reduziu significativamente a miocardite, preservou a arquitetura das fibras musculares e diminuiu a carga parasitária cardíaca, apresentando efeito semelhante ao benznidazol e superior ao AD06. Esses resultados reforçam que a redução do parasitismo contribui diretamente para a menor resposta inflamatória tecidual, uma vez que a persistência do parasito constitui um dos principais estímulos para a progressão da cardiomiopatia chagásica (RASSI et al., 2017). Além disso, as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do fragmento derivado do eugenol provavelmente contribuíram para a preservação do tecido cardíaco (WEN et al., 2018).

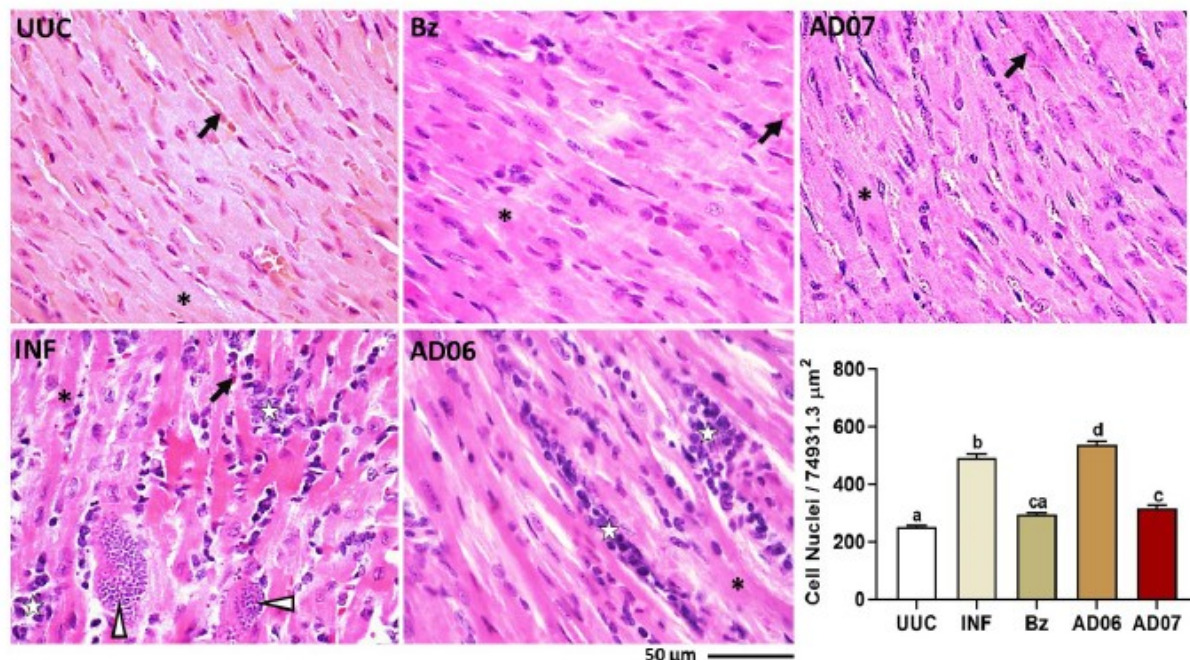


Figura 7. Imagens microscópicas e celularidade intersticial (gráfico) do coração de camundongos não infectados e infectados pelo *T. cruzi*, tratados com novos híbridos à base de metronidazol/eugenol (AD06 e AD07) e com benznidazol (Bz). (Microscopia de campo claro, coloração por hematoxilina e eosina, barra de escala = 50 µm). UN: não detectável. UUC: Controle não infectado e não tratado (n=10); INF: infectado e não tratado (n=8); Bz: infectado tratado com 100 mg/kg de benznidazol (n=8); AD06: infectado tratado com 100 mg/kg de AD06 (n=8); AD07: infectado tratado com 100 mg/kg de AD07 (n=8). Imagens microscópicas: Asterisco = cardiomiócitos, ponta de seta = ninhos de amastigotas, seta = vasos sanguíneos, estrela = infiltrado inflamatório. No gráfico, os dados são expressos como média e erro padrão. a, b, c Grupos marcados com letras diferentes apresentam diferença estatística ($P < 0,05$), e grupos marcados com alguma letra em comum não apresentam diferença estatística ($P > 0,05$) segundo a Análise de Variância de Postos de Kruskal-Wallis de via única seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que a combinação entre reposicionamento de fármacos e hibridação molecular constituiu uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos contra *Trypanosoma cruzi*. Os híbridos metronidazol-eugenol apresentaram atividade tripanocida, baixa citotoxicidade e elevada seletividade, destacando-se o AD07 por reduzir o parasitismo, o estresse oxidativo e o dano aos cardiomiócitos, além de inibir a tripanotiona redutase, reduzir a parasitemia e atenuar a miocardite experimental sem evidências de hepatotoxicidade. Em conjunto, os achados indicam que o AD07 reúne características farmacológicas promissoras para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes para a doença de Chagas. Embora parte de seu efeito cardioprotetor possa ser atribuída à redução da carga parasitária, a possível contribuição de mecanismos anti-inflamatórios diretos deve ser investigada em estudos futuros, visando ampliar a compreensão de seu potencial terapêutico.



Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, processos APQ-01895-16, PPM-00687-17 e PPM-00077-18), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 303972/2017-3, 423594/2018-4, 154209/2025-2, 305093/2017-7 e MCTIC 408503/2018-1), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, financiamento código 001).

Referências

- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D. A.; GARCÍA-RODRÍGUEZ-ARANA, R.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, A.; et al. A systematic review of historical and current trends in Chagas disease. **Ther. Adv. Infect. Dis.** 8(1), 20499361211033715, 2021.
- ANTINORI S, GALIMBERTI L, BIANCO R, et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **Eur J Intern Med.** 43:6–15, 2017.
- BONNEY KM, GIFFORD KM, TAYLOR JM, CHEN CI, ENGMAN DM. Cardiac damage induced by immunization with heat-killed *Trypanosoma cruzi* is not antibody mediated. **Parasite Immunol.** 35(1):1-10, 2013.
- BONNEY KM, LUTHRINGER DJ, KIM SA, GARG NJ, ENGMAN DM. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annu Rev Pathol.** 24;14:421-447, 2019.
- BRANCAGLION GA, et. Al. In vitro and in vivo trypanocidal activities of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-cromen-2-one, a new synthetic coumarin of low cytotoxicity against mammalian cells. **ChemBiol Drug Des.** 92(5):1888-1898, 2018.
- BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop.** 4:389-96, 1962.
- CALDAS IS, SANTOS EG, NOVAES RD. An Evaluation of Benznidazole as a Chagas Disease Therapeutic. **Expert OpinPharmacother.** 20:1797-1807, 2019.
- CHAO C, LEONE JL, VIGLIANO CA. Chagas disease: Historic perspective. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 1866(50): 165689,2020.
- CONNERS, ERIN E. et al. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta Tropica.** Estados Unidos da América. 156: 68–78, 2016.
- DINIZ LF, MAZZETI AL, CALDAS IS, RIBEIRO I, BAHIA MT. Outcome of E1224-Benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant *Trypanosoma cruzi* strain in mice. **AntimicrobAgentsChemother.** 62(6):e00401-18, 2018.
- FILARDI LS, BRENER Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 81(5):755-9, 1987.
- GONÇALVES-SANTOS E, et. al. Sesquiterpene lactone potentiates the immunomodulatory, antiparasitic and cardioprotective effects on anti-*Trypanosoma cruzi* specific chemotherapy. **IntImmunopharmacol.** 77:105961, 2019.
- LIDANI, KÁRITA CLÁUDIA FREITAS et al. “Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem.” **Frontiers in public health.** 7(2) 166, 2019.



MAZZETI AL, et, al. Synergic effect of allopurinol in combination with nitroheterocyclic compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**. 63(6) e02264-18, 2019.

MURPHY N, et al. Assessing antibody decline after chemotherapy of early chronic Chagas disease patients. **Parasit Vectors**. 20;14(1) 54, 2021.

NOVAES RD, SANTOS EC, FIALHO MDCQ, GONÇALVES WG, SEQUETTO PL, TALVANI A, GONÇALVES RV. Nonsteroidal anti-inflammatory is more effective than anti-oxidant therapy in counteracting oxidative/nitrosative stress and heart disease in *T. cruzi*-infected mice. **Parasitology**. 144(7) 904-916, 2017.

NOVAES RD, et al. Purinergic antagonist suramin aggravates myocarditis and increases mortality by enhancing parasitism, inflammation, and reactive tissue damage in *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. **Oxid Med Cell Longev**. (2018) 7385639, 2018.

PELOZO MF, LIMA GFS, CORDEIRO CF, SILVA LS, CALDAS IS, CARVALHO DT, LAVORATO SN, HAWKES JA, FRANCO LL. Synthesis of new hybrid derivatives from metronidazole and eugenol analogues as trypanocidal agents. **J Pharm Pharm Sci**. 24:421-434, 2021.

PÉREZ-MOLINA JA, MOLINA I. Chagas disease. *Lancet*. 391(10115) 82-94, 2018.

PETERSEN CA, BURLEIGH BA. Role for interleukin-1 β in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect. Immun**. (71) 4441-47, 2003.

RASSI A., MARIN-NETO J. A., RASSI A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Mem Inst Oswaldo Cruz. Brasil**. 112 (3) 224-235, 2017.

RODRIGUES JPF, CALDAS IS, GONÇALVES RV, ALMEIDA LA, SOUZA RLM, NOVAES RD. S. mansonii-T. cruzi co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**. 1(66)43-52, 2017.

SEQUETTO PL, et. al, Naringin accelerates the regression of pre-neoplastic lesions and the colorectal structural reorganization in a murine model of chemical carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**. 64 (200) 9, 2014.

SOUZA-SILVA TG, et. al., Impact of diminazene aceturate on renin-angiotensin system, infectious myocarditis and skeletal myositis in mice: An in vitro and in vivo study. **Life Sci**. 15(257):118067, 2020.

TARDIEUX I, WEBSTER P, RAVESLOOT J, BORON W, LUNN JA, HEUSER JE, ANDREWS NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**. 71(7):1117-30, 1992.

VAN DEN BOGAART E, et. al., Simple colorimetric trypanothione reductase-based assay for highthroughput screening of drugs against *Leishmania* intracellular amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**. 4;58(1):527-35, 2014.

VILAS-BOAS DF, et. al., 4-nitrobenzoylcoumarin potentiates the antiparasitic, anti-inflammatory and cardioprotective effects of benznidazole in a murine model of acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Trop**. 228:106314, 2022.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, 53(1) 55–65, 1976.

WEN JJ, DHIMAN M, WHORTON EB, GARG NJ. Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Microbes Infect**. 10(10-11):1201-9, 2008.



WHO, World health organization: Chagas disease (American trypanosomiasis). Acesso em 30 de Julho de 2026.

[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

ZUMA AA, DE SOUZA W. Chagas Disease Chemotherapy: What Do We Know So Far? **Curr Pharm Des.** (27) 3963-3995, 2021.