



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Alessandra de Castilho

**EFEITOS DA AMIODARONA NA FASE AGUDA
DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Uberaba-MG
Setembro de 2016

ALESSANDRA DE CASTILHO

**EFEITOS DA AMIODARONA NA FASE AGUDA
DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba-MG
Setembro de 2016

ALESSANDRA DE CASTILHO

**EFEITOS DA AMIODARONA NA FASE AGUDA
DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

16 de Setembro de 2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me iluminar, guiar, dar paciência, sabedoria e resignação nos momentos em que mais precisei;

A meu orientador Prof. Dr. Valdo José Dias, da Silva, por me aceitar na orientação;

A meu esposo Ton, pelo imenso companheirismo e incentivo;

À toda minha família, pelo incentivo e amor;

Aos novos amigos “conquistados” durante a pós-graduação Fernanda, Camila, Lívia, Angélica, Lucas, Marília, Thales, Carolina Capitelli, Lidiane, Liciane, Renato entre outros, por me ajudarem nos experimentos, pelos conselhos, conversas, brincadeiras e ensinamentos em todos os momentos;

A todos os colaboradores do laboratório de Parasitologia da UFTM, em especial ao Luciano, de grande valia na parte de experimentação animal; à Professora Dra Eliane Lages pela grande colaboração e à Doutoranda Katimylla pela grande ajuda na parte molecular do experimento.

Ao amigo, responsável pelo biotério da Universidade de Uberaba (UNIUBE) Luiz Fernando, por me ajudar com os animais do experimento.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFTM, em especial aqueles que tive o prazer de ser aluna e, que serviram e servirão como exemplos de profissionais inspiradores e competentes.

A secretária do curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Bete, por todo o carinho, atenção, empenho e profissionalismo em nos atender e tentar da melhor forma possível nos ajudar.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e atinge aproximadamente 7 milhões de pessoas no mundo. Na fase aguda da infecção, 60-70% dos indivíduos são assintomáticos, enquanto 25-30% irão desenvolver cardiomiopatia. Dentre os fármacos mais utilizados na terapia da doença de Chagas, o benznidazol é o mais usado no Brasil, porém o tratamento requer um tempo prolongado e esse fator é pouco tolerado pelo paciente em função dos efeitos adversos, além de possuir eficácia variável na fase crônica. Dessa forma, novas alternativas terapêuticas devem ser investigadas. Nesse contexto, a amiodarona, que possui ação antiarrítmica na fase crônica da doença, também já demonstrou ação tripanocida *in vitro*. Assim, nosso trabalho avaliou o efeito desta droga na fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos *Balb/c* infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Os animais foram tratados por 20 dias durante a fase aguda da infecção e o eletrocardiograma foi realizado no dia zero e no 21º dia pós infecção. Após a eutanásia dos animais, fragmentos do coração foram coletados para análise histopatológica e para identificar a presença do DNA do parasito por PCR específica. Além disso, foi utilizada a técnica de LSSP-PCR para detectar diferenças nas assinaturas genéticas do parasito nos animais tratados e não tratados. Ao analisar a curva de parasitemia, o pico parasitêmico e a área sob a curva dos animais infectados e tratados com amiodarona, não houve diferença significativa comparada aos animais não tratados ($26,8 \pm 4$, 1milhões/mL.dia versus $38,3 \pm 8,3$ milhões/mL, respectivamente, $p=0,232$). Entretanto, os animais tratados tiveram um traçado eletrocardiográfico com melhora na duração do complexo QRS, quando comparado ao grupo não tratado ($10,78 \pm 0,49$ ms versus $12,82 \pm 0,59$ ms, respectivamente, $p=0,020$). A análise histopatológica do tecido cardíaco evidenciou presença de infiltrado inflamatório em átrio, ventrículo e epicárdio, onde houve redução do processo inflamatório notadamente no epicárdio com o tratamento com amiodarona. Utilizando a técnica de LSSP-PCR observou-se uma distinção nos perfis de assinatura gênica do parasito, quando comparados os corações dos animais tratados e não tratados. Em resumo, apesar de não modificar significativamente a parasitemia, a amiodarona atuou de forma protetora atenuando as alterações eletrocardiográficas e histopatológicas cardíacas na fase aguda da infecção experimental em camundongos. Nossos resultados reforçam o potencial emprego deste fármaco na terapia da doença de Chagas na fase aguda.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, fase aguda, amiodarona, miocárdio, terapia.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects approximately 7 million people throughout the world. During acute phase of infection, 60-70% of patients are asymptomatic, among them 25-30% will develop cardiomyopathy. Within the drugs used to treat Chagas disease, benznidazol is the most used in Brazil. Treatment is given for long periods, patients present several side effects, and the therapy presents variable efficacy in chronic phase. Thus, it is clear the necessity for new therapeutic approaches. Amiodarone, which has antiarrhythmic action in the chronic phase of the disease, has also shown *in vitro* trypanocidal effects. Our study aimed to evaluate the effects of this drug during acute phase of experimental Chagas disease in Balb/c mice infected with the Y strain of *T. cruzi*. Mice were treated for 20 days during the acute phase of the infection and the electrocardiogram (ECG) was performed on days 0 and 21 post infection. After euthanasia, heart fragments were collected for histopathologic analysis and to identify the presence of *T. cruzi* kDNA by specific PCR. The LSSP-PCR technique was used to detect differences in the genetic signatures of the parasite in both treated and untreated mice. By analyzing the curve, the peak of blood parasitism and the area under the curve, no differences were detected between treated and untreated mice (26.8 ± 4.1 millions/mL.day versus 38.3 ± 8.3 millions/mL.day, respectively, $p=0.232$). However, treated mice had ECGs with improved QRS duration when compared to the untreated group (10.78 ± 0.49 ms versus 12.82 ± 0.59 ms, respectively, $p=0.020$). Histopathological analysis of heart showed the presence of inflammatory infiltrate in the atrium, ventricle and epicardium. The latter showed a reduction in the inflammatory infiltrate in mice treated with amiodarone. The LSSP-PCR technique showed a distinctive gene signature of the parasite in the heart of treated and untreated mice. In conclusion, despite of amiodarone seems not to have a direct effect towards blood parasitism, this drug prevented the worsening of electrocardiographic and histopathologic parameters in the acute phase of experimental infection in mice. Our results reinforce the potential of this drug as an alternative therapy for Chagas disease during acute phase.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, acute phase, amiodarone, myocardial, therapy.

Lista de ilustrações

		Pág.
Figura 1	Distribuição geográfica de indivíduos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> . Estimativa oficial de transmissão vetorial entre 2006-2009, (WHO).....	11
Figura 2	Representação esquemática da secção longitudinal da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 3	Representação esquemática de um acidocalcisomo de um tripanonossomatídeo.....	14
Figura 4	Formas reprodutivas dos Tripanossomatídeos.....	15
Figura 5	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.....	17
Figura 6	Estrutura química da benznidazol e nifurtimox.....	22
Figura 7	Estrutura química da amiodarona.....	26
Figura 8	Linha do tempo utilizada no experimento.....	34
Figura 9	Curvas parasitêmicas realizadas, segundo Brener(1962), (em milhões de parasitas/mL \pm erro padrão da média) nos diferentes dias de análise nos dois grupos estudados: grupo infectado não tratado (CH-NT) e grupo infectado tratado com amiodarona (CH-T).....	44
Figura 10	Área sob a curva dos animais infectados tratados ou não com amiodarona.....	44
Figura 11	Fotomicrografias de luz comum coradas pelo HE, de cortes teciduais cardíacos atriais (painéis superiores A, B e C), ventriculares (painéis centrais D, E e F) e de epicárdio (painéis inferiores G, H e I) de animais representativos dos grupos controle (painéis A, D e G), infectado não tratado (painéis B, E e H) e infectado tratado com amiodarona (painéis C, F e I).....	49
Figura 12	Gel representativo de produtos da reação de PCR de tecidos cardíacos utilizando iniciadores 121-122 após amplificação em gel de poliacrilamida a 7,5% dos animais infectados não tratados (CH-NT) e dos animais infectados tratados com amiodarona (CH-T).....	50
Figura 13	Gel representativo de produtos da reação de LSSP-PCR dos tecidos cardíacos, utilizando o iniciador S35G, após amplificação em gel de poliacrilamida a 7,5%, dos animais infectados não tratados (CH-NT) e dos animais infectados tratados com amiodarona (CH-T)	51
Figura 14	Gel representativo de produtos da reação de LSSP-PCR dos tecidos cardíacos, utilizando o iniciador S35G, após amplificação em gel de poliacrilamida a 7,5%.....	52
Quadro 15	Alguns dos alvos terapêuticos pesquisados na substituição ou combinação com a terapia clássica.....	24

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 Grupos de estudo.....	33
Tabela 2 Classificação da intensidade do processo inflamatório em cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina.....	38
Tabela 3 Análise do eletrocardiograma inicial dos animais controle (CO), infectados não tratados (CH-NT) e infectados tratados com amiodarona (CH-T) antes do inoculo.....	45
Tabela 4 Análise do eletrocardiograma final registrado 21 dias depois do inoculo nos animais controle não tratados (CO), infectados não tratados (CH-NT) e infectados tratados com amiodarona (CH-T)	46
Tabela 5 Pontuações atribuídas ao infiltrado inflamatório em diferentes regiões do coração e contagem de ninhos de parasito de cada animal do grupo infectado não tratados.....	47
Tabela 6 Pontuações atribuídas ao infiltrado inflamatório em diferentes regiões do coração e contagem de ninhos de parasita de cada animal do grupo infectado tratado com amiodarona.....	48
Tabela 7 Valores medianos das pontuações para miocardite atrial, miocardite ventricular e epicardite, bem como o “score” global dos animais controle não tratados (CO), infectados não tratados (CH-NT) e infectados tratados com amiodarona (CH-T).....	48

Lista de abreviaturas e siglas

μL	Microlitros
CH-NT	Animal infectado não tratado
CH-T	Animal infectado tratado com amiodarona
CO-NT	Animal controle não tratado
CPT1	Carnitina palmitoiltransferase
CYP51	C14 esterol demetilase
ECG	Eletrocardiograma
Fe-SOD	Superóxido dismutase de ferro
GIPLs	Glicoinositolfosfolipídeos
gRNA	RNA guia
HCl	Ácido clorídrico
iNOS	Sintase induzível de óxido nítrico
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
LSSP-PCR	<i>Low Stringency Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction</i>
Mg	Miligramas
MgCl ²	Cloreto de Magnésio
mL	Militros
mm	Milímetros
mM	Mili-molar
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
PA	Para análise
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fósforo inorgânico
poli P	Polifosfato
PPi	Pirofosfato inorgânico
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TS	Trans-sialidase
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	BIOLOGIA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.1.1	Características citológicas	12
1.1.2	Ciclo biológico e transmissão	15
1.2	FASE AGUDA E CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
1.3	TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	21
1.3.1	Novas estratégias terapêuticas anti-<i>T. cruzi</i>	23
1.3.2	Amiodarona	26
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	METODOLOGIA	32
4.1	ANIMAIS E TRATAMENTO.....	33
4.2	LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO.....	34
4.3	INOCULAÇÃO DO PARASITO.....	34
4.4	AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA.....	35
4.5	REGISTRO DO ELETROCARDIOGRAMA.....	35
4.6	ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO.....	36
4.6.1	Coleta de tecidos	36
4.6.2	Histopatologia	37
4.7	EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS.....	38
4.8	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DAS POPULAÇÕES.....	39
4.8.1	Amplificação específica	39
4.8.2	LSSP-PCR (<i>Low Stringency Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction</i>)	39
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS	42
5.1	INGESTÃO DIÁRIA DA AMIODARONA.....	43
5.2	ANÁLISE DA INFECÇÃO PARASITÁRIA NA FASE AGUDA.....	43
5.3	ANÁLISE DO ELETROCARDIOGRAMA.....	45
5.4	ANÁLISE DA HISTOLOGIA DO CORAÇÃO.....	47
5.5	AVALIAÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)	50
5.5.1	Presença do parasito por PCR específica	50
5.5.2	Variabilidade do kDNA nos grupos de infecção pela técnica de LSS-PCR	51
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

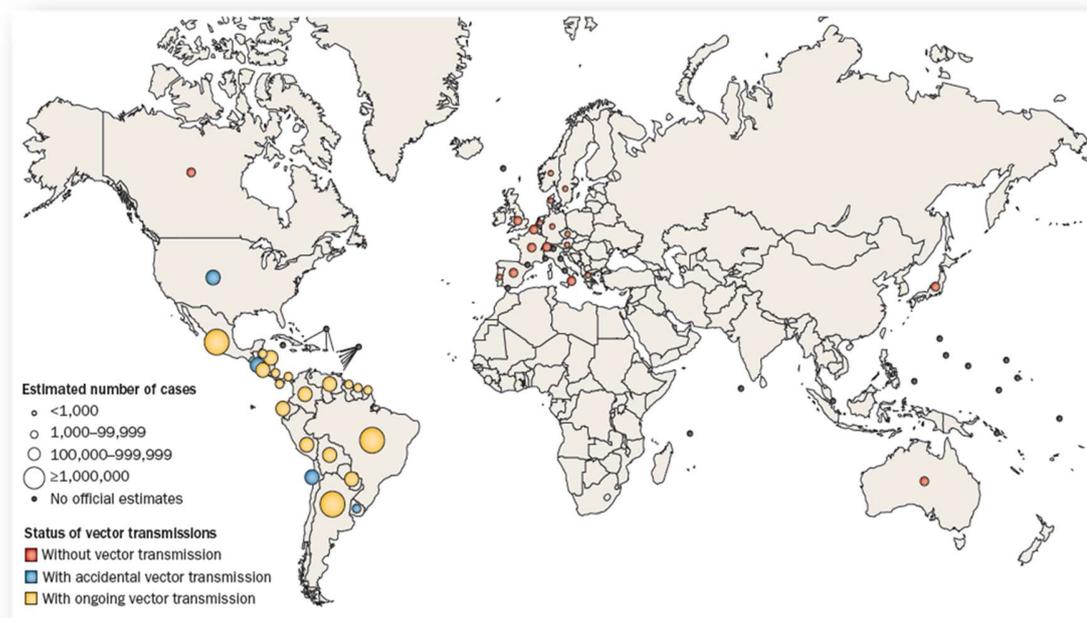
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e, é uma causa importante de mortalidade e de morbidade atingindo entre 6-7 milhões de pessoas no mundo (FIG 1), principalmente na América Latina, sendo responsável por 15.000 óbitos por ano (Nunes *et al.*, 2013; Who, 2016).

Mais de um século depois da descoberta da doença pelo médico brasileiro e parasitologista Carlos Chagas, a tripanossomíase americana (Doença de Chagas) continua entre as mais negligenciadas de todas as doenças tropicais, representando um grave problema econômico e de saúde para a maioria dos países da América Latina (Stimpert e Montgomery, 2010; Hotez *et al.*, 2012).

FIGURA 1- Distribuição geográfica de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Estimativa oficial de transmissão vetorial entre 2006-2009, reproduzido com permissão de WHO.



Fonte: Ribeiro, A. L. *et al. Nat. Rev. Cardiol.* 9, 576–589 (2012)

A primeira descrição do *T. cruzi* foi feita por Carlos Chagas no estado de Minas Gerais em 1909. Ele descreveu o agente causador, o transmissor e o modo de transmissão da doença além

de comprovar a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasito (Chagas, 1909).

1.1 Biologia do *Trypanosoma cruzi*

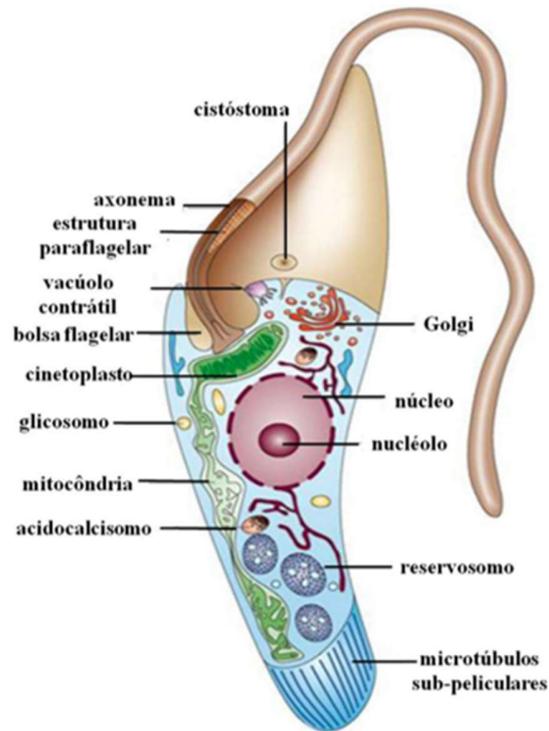
1.1.1 Características citológicas

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, que possui além do DNA nuclear (FIG 2), um DNA localizado em uma região da mitocôndria que é única e ramificada, denominada de cinetoplasto (kDNA), que compreende aproximadamente 20-25% do DNA celular total (Souza, 2003).

O parasito apresenta, além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi e mitocôndria, algumas estruturas peculiares citoplasmáticas, como os microtúbulos sub-peliculares, a estrutura paraflagelar, os reservossomos, o cinetoplasto, os glicossomos e os acidocalcisomos (FIG 2), como anteriormente revisado (De Souza, 1984; 2002).

Como mencionado, o cinetoplasto é uma massa de DNA circular, em forma de rede, onde se encontram inúmeras cópias de genoma mitocondrial (Klingbeil e Englund, 2004). Na mitocôndria dos tripanossomatídeos os DNAs circulares são interconectados por dois tipos de moléculas: maxicírculos e minicírculos onde os primeiros, que correspondem a 10% do cinetoplasto, são homólogos ao DNA mitocondrial das células eucarióticas além de serem responsáveis pela maquinaria da tradução, codificando o RNA ribossomal, e as proteínas que fazem parte da cadeia respiratória. Já os últimos, correspondem a 90% do volume do cinetoplasto e codificam gRNA (RNA guia) que atua na edição do RNA mensageiro codificado pelo maxicírculo (Shapiro e Englund, 1995).

FIGURA 2- Representação esquemática da secção longitudinal da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

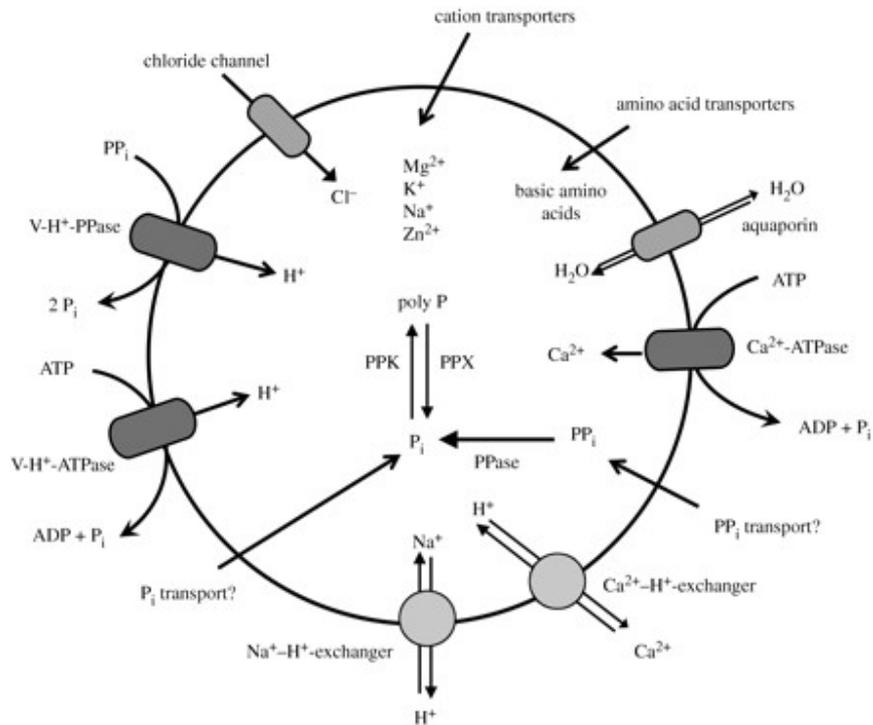


Fonte: (Docampo *et al.*, 2005) : *Nature Reviews Microbiology*

O acidocalcisomo é uma organela citoplasmática de pH ácido devido a ação de um próton ATPase do tipo vacuolar e uma Ca^{2+} -ATPase (FIG 3). Esta estrutura armazena fósforo inorgânico (Pi), pirofosfato inorgânico (PPi) e polifosfato (poli P), atuando na manutenção da homeostasia, adaptação e sobrevivência do parasito durante todo o ciclo evolutivo, além do pH e osmorregulação (FIG 3) (Docampo *et al.*, 2005; Moreno e Docampo, 2009). A membrana desta organela é rica em glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) e apresenta várias bombas, permutadores e pelo menos um canal (Scott e Docampo, 2000; Salto *et al.*, 2008). Entre suas várias funções, o acidocalcisomo é responsável pela homeostase de Ca^{2+} e outros íons essenciais para a sobrevivência do parasito (Docampo *et al.*, 1995). O influxo de Ca^{2+} é feito através da ATPase de Cálcio. A membrana do acidocalcisomo possui ainda as bombas ATPase de H^+ e a H^+ pirofosfatase vacuolar, responsáveis pela regulação da passagem de prótons. A maioria dos tripanossomatídeos apresenta ainda um permutador Na^+/H^+ na membrana do acidocalcisomo, contudo o *T. cruzi* não possui este

sistema (Montalvetti *et al.*, 2004). Além disso, este protozoário possui aquaporinas (FIG 3) essenciais para a osmorregulação (Rohloff *et al.*, 2004).

FIGURA 3- Representação esquemática de um acidocalcisomo de um tripanonossomatídeo.



Fonte: Do Campo *et al.*, 2010: Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010 Mar 12; 365(1541): 775–784.365(1541): 775–784.

Há também estruturas chamadas de reservossomos que são organelas da via endocítica encontradas na forma epimastigota do *T. cruzi*. Os reservossomos são o ponto final de todas as macromoléculas capturadas no meio extracelular, ingeridas pelo processo endocítico do parasita. Essas organelas são responsáveis pelo armazenamento de proteínas, lipídios e proteases importantes como a cruzipaina (Sant'anna *et al.*, 2008). Cruzipaina é também conhecida como GP 57/51 ou cruzaina, a principal cisteína protease do *T. cruzi*. Ela tem papel fisiológico para o parasito na nutrição, crescimento, proliferação e diferenciação. Além disso, essa protease auxilia o parasito no papel patogênico como adesão, escape, disseminação e imunomodulatório (Branquinha *et al.*, 2015).

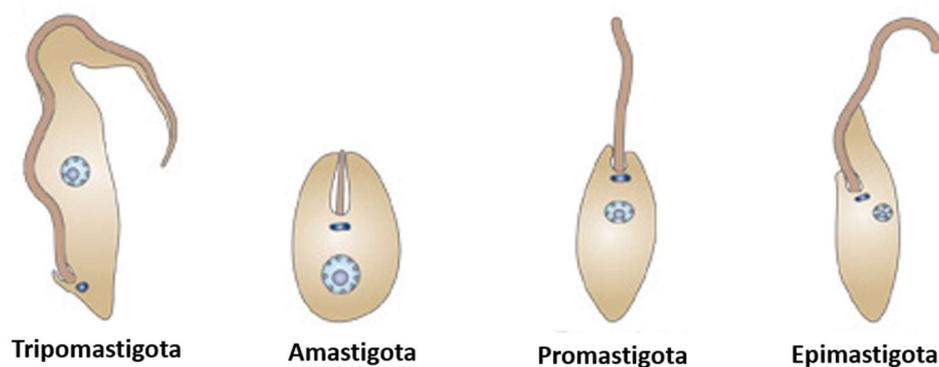
Ainda, o *T. cruzi* não apresenta estruturas citoesqueléticas transcelulares como filamentos e microfilamentos, embora tenha sido identificado actina no parasito. Contudo, o parasito possui um arranjo microtubular que envolve o corpo celular do protozoário e constitui o citoesqueleto associado à membrana denominado microtúbulos sub-peliculares (FIG 2B). Estas estruturas estão presentes em todo o ciclo celular e são responsáveis pelas diferentes formas e formatos do parasito durante este ciclo (Okuda *et al.*, 1999).

No citoplasma, estão os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo onde ocorre a maioria dos processos glicolíticos, por isso a denominação glicossomos (FIG 2B). Além disso, outros processos bioquímicos ocorrem nesta estrutura como: fixação de dióxido de carbono, salvamento de purinas, biossíntese de novo de pirimidinas, alongamento de ácidos graxos e biossíntese de isoprenóides e esterol (Opperdoes, 1987).

1.1.2 Ciclo biológico e transmissão

O parasito possui, dentre os tripanossomatídeos, um dos mais complexos ciclos biológicos com a presença de diferentes formas evolutivas, relacionadas com o hospedeiro vertebrado ou invertebrado. As formas evolutivas são: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas demonstradas na FIG 4 (De Souza, 2008).

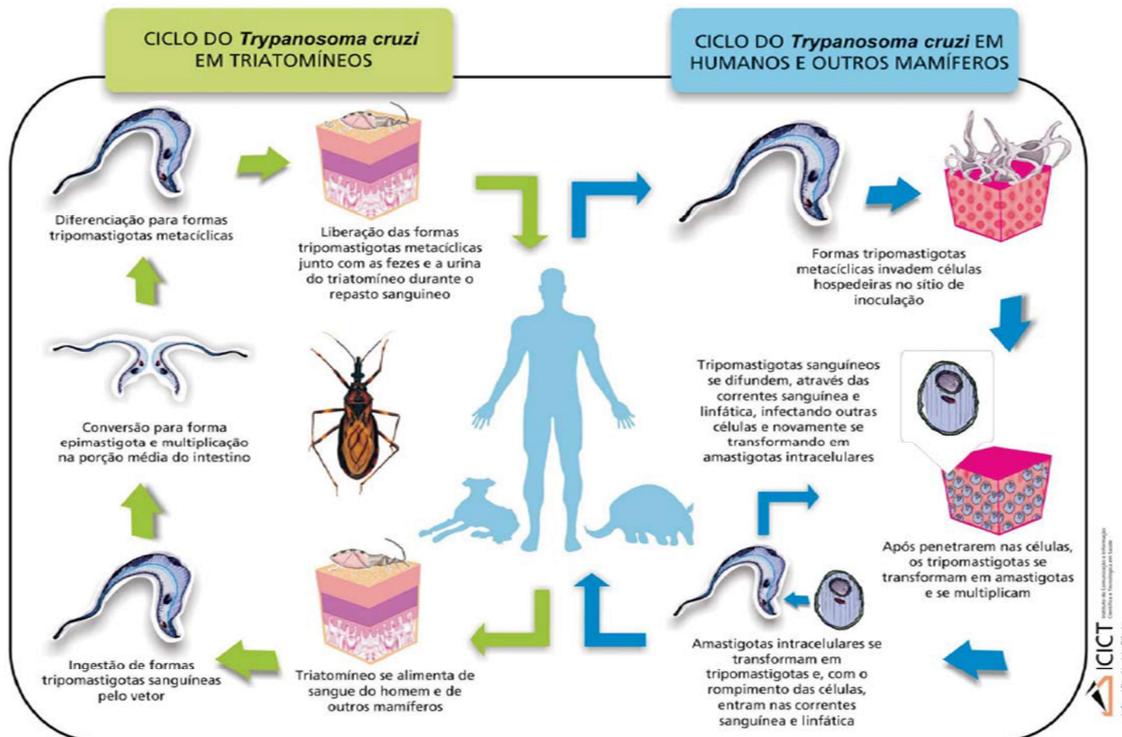
FIGURA 4- Formas reprodutivas dos Tripanossomatídeos.



Fonte: (Docampo *et al.*, 2005) : *Nature Reviews Microbiology*

A FIG 5 mostra o ciclo do *T. cruzi*, desde o momento da hematofagia do inseto que será infectado com formas tripomastigotas presentes em um hospedeiro vertebrado, até seu ciclo reprodutivo no triatomíneo e infecção de um novo hospedeiro. Ao realizar o repasto sanguíneo, o vetor (triatomíneo) ingere formas tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro infectado. A seguir, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que se reproduzem no intestino médio do vetor. As epimastigotas migram para o intestino grosso onde passarão por um intenso processo de divisão e multiplicação e após adesão às membranas perimicrovilares, se dirigem para a porção mais posterior do intestino médio, culminando com a diferenciação em tripomastigotas metacíclicas infectantes, que são excretadas junto com as fezes quando o vetor realiza o repasto sanguíneo (Chagas, 1909; 1911; Alves *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2007; Nogueira *et al.*, 2007). Essas formas não penetram ativamente na pele íntegra, é necessário a abertura de um canal, como o criado pelo triatomíneo no momento do repasto sanguíneo. Assim, quando o hospedeiro coça o local ele acaba por facilitar a entrada do parasito no organismo. No citoplasma de células nucleadas do hospedeiro, como macrófagos, há a formação do vacúolo parasitóforo e a diferenciação da forma tripomastigota nas formas amastigotas intracelulares, que replicam, com tempo de duplicação de cerca de 12 horas, ao longo de um período de 4 a 5 dias. No final deste período, o vacúolo é lisado por enzimas secretadas pelo parasito e as amastigotas entram em contato direto com as organelas das células do hospedeiro, multiplicam-se e novamente se diferenciam em tripomastigotas as quais rompem a célula e ganham a circulação. Os parasitos circulantes podem então invadir novas células e iniciar novos ciclos replicativos. Além disso, ficam disponíveis para infectar vetores que quando infectados, podem transmitir o parasito para outros hospedeiros (De Carvalho e De Souza, 1989).

FIGURA 5- Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.



Fonte: ICICT/FIOCRUZ- Venício Ribeiro

Os vetores com potencial para transmitir *T. cruzi* compreendem mais de 130 espécies de triatomíneos da família Reduviidae, subfamília Triatominae. Dessas, 52 espécies foram descritas no Brasil e apenas cinco, são epidemiologicamente importantes: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* (Lent e Wigodinsky, 1979; Forattini, 1980; Buscaglia e Di Noia, 2003; Coura, 2008).

Além da transmissão vetorial, a doença pode também ser transmitida através da transfusão de sangue, que é um assunto de preocupação em regiões não endêmicas como na América do Norte e Europa (Garraud *et al.*, 2007). Ainda, ela pode ser transmitida por transplante de órgãos ou de forma vertical, da mãe para feto (Prata, 2001). A transmissão oral ganhou importância epidemiológica após pequenos surtos esporádicos da doença em seres humanos, principalmente na região amazônica, causada por contaminação de sucos, água ou sopa com *T. cruzi* oriundos de triatomíneos infectados ou outros hospedeiros (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991;

Dias *et al.*, 2008; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). Embora de ocorrência muito baixa, a transmissão laboratorial acidental já foi também relatada (Leiby *et al.*, 2008; Huprikar *et al.*, 2013).

1.2 FASE AGUDA E FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS

O período de incubação após a exposição ao *T. cruzi* varia de acordo com a forma de transmissão: vetorial de 4 a 15 dias; transfusional de 30 a 40 dias ou mais; vertical pode ser transmitida em qualquer período da gestação ou durante o parto; oral de 3 a 22 dias e acidental até aproximadamente 20 dias. Após essa fase tem início a fase aguda onde há replicação parasitária ativa detectável microscopicamente no sangue periférico, sendo quase sempre assintomática, com raros casos sintomáticos, pois há uma ampla variedade de células parenquimatosas parasitadas, incluindo as do trato gastrointestinal (do cólon e do esôfago), cérebro e especialmente as do coração (Rassi *et al.*, 2010).

Quando a infecção é sintomática, os seguintes sinais e sintomas podem ser observados: meningoencefalite (com alta taxa de mortalidade em crianças menores de três anos), adenomegalia, febre, edema palpebral - chagoma de inoculação ou sinal de Romana, hepato-esplenomegalia, miocardite e disfagia (Macedo e Pena, 1998; Prata, 1999; Coura e Dias, 2009; Who, 2010).

Após 4 a 8 semanas da fase aguda, a replicação é controlada pela resposta imune do hospedeiro. Inicia-se então, a fase crônica onde a parasitemia diminui para níveis indetectáveis pelo exame direto a fresco. No entanto, amastigotas intracelulares de *T. cruzi* permanecem infectando tecidos, especialmente nos músculos cardíaco e esquelético. Dessa forma, a fase crônica pode apresentar formas clínicas variadas devido em grande parte à diversidade biológica, bioquímica e genética do parasito além de fatores genéticos e imunes do hospedeiro. Nesta fase, a maioria dos pacientes permanece assintomática (forma indeterminada). Porém, podem desenvolver manifestações cardíacas, digestivas, cardio-digestivas e neurológicas (principalmente em imunodeprimidos) (Dias, 1994; Macedo e Pena, 1998; Almeida *et al.*, 2009). A reativação da fase crônica da doença de Chagas pode vir associada com co-morbidades tais como HIV/AIDS, transplante de órgãos ou terapia imunossupressiva (Ferreira e Borges, 2002).

Embora seja mais difícil encontrar um paciente com a forma aguda da doença, já que a maioria é assintomático, o tratamento específico é realizado em todos os casos de fase aguda, independentemente do mecanismo de transmissão. Ainda, as alterações no músculo cardíaco provocadas pela infecção pelo parasito, são responsáveis por até 30% da morbi-mortalidade de indivíduos sintomáticos na fase crônica (Lopes, 1999). Dessa forma, em função da grande quantidade de efeitos colaterais associados ao uso das drogas disponíveis e, de eventuais complicações decorrentes da infecção pelo *T. cruzi*, o estudo de novas estratégias terapêuticas que apresentem menor toxicidade e maior eficácia, se faz necessário.

Os óbitos na cardiomiopatia chagásica crônica devem-se primariamente à morte súbita (55%-65%), progressão da insuficiência cardíaca (20-25%) e complicações tromboembólicas (10%-15%). Nos estudos que consideraram apenas pacientes hospitalizados, houve maior incidência de morte súbita particularmente nos pacientes com arritmias cardíacas relacionada à insuficiência cardíaca (O'daly *et al.*, 1994).

A fisiopatologia da lesão miocárdica ocorre pela lesão direta causada pelas formas amastigotas do parasito, gerando uma resposta inflamatória intensa no hospedeiro, e resultando em miocardite focal a multifocal, fibrose e conseqüente comprometimento contrátil da função do miocárdio (Elizari e Chiale, 1993; Rassi Jr *et al.*, 2009; Muratore e Baranchuk, 2010). Este padrão difuso de miocardite serve como substrato anatômico para os padrões eletrocardiográficos de distúrbios da condução intraventricular e as arritmias atriais e ventriculares visto em formas avançadas de cardiomiopatia chagásica (Elizari e Chiale, 1993; Muratore e Baranchuk, 2010). Nesse contexto, o ECG tem sido o instrumento diagnóstico mais utilizado na avaliação de pacientes com doença de Chagas, sendo considerado como o método mais sensível na detecção de comprometimento cardíaco em todas as faixas etárias, e o que se altera mais precocemente (Pifano, 1973; Maguire *et al.*, 1987). Assim, com a inflamação do tecido cardíaco a condução elétrica é alterada, servindo de substrato para alterações eletrocardiográficas como prolongamento de complexo QRS e do intervalo QT (Souza *et al.*, 2013).

Outro achado frequente em pacientes com doença de Chagas são as arritmias cardíacas (taquicardia ventricular, bradicardia sinusal, bloqueio de ramo direito, batimentos prematuros e fibrilação atrial (Elizari e Chiale, 1993). Ainda, é importante salientar, que mesmo pacientes em fase aguda da doença de Chagas podem apresentar alterações detectáveis pelo ECG (Elizari e Chiale, 1993). No entanto, essas alterações eletrocardiográficas evidentes podem estar ausentes

mesmo nos pacientes chagásicos crônicos que tiveram morte súbita (Bestetti *et al.*, 1996; Aguilar *et al.*, 2007). Assim, o complexo cenário envolvendo aspectos inerentes ao parasito e ao hospedeiro, parece também influenciar o aparecimento de alterações.

Além das alterações eletrocardiográficas, as alterações histopatológicas promovidas pela presença do *T. cruzi*, principalmente no músculo cardíaco, também são alvos de diferentes estudos. Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados pelo parasito desenvolvem cardiopatia chagásica na fase crônica. Dessa forma, a presença de hipertrofia do músculo cardíaco, miocardite e fibrose têm sido amplamente identificadas e estão associadas ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva e ao aparecimento de alterações eletrocardiográficas (Lopes *et al.*, 1981; Lopes, 1999; Higuchi Mde *et al.*, 2003).

Um estudo desenvolvido na Venezuela, que acompanhou durante 8 anos 58 casos diagnosticados na fase aguda da doença de Chagas, descreveu importantes alterações funcionais e histopatológicas no coração desses indivíduos. De forma geral, o achado predominante foi a cardiomegalia, principalmente em função da efusão pericárdica. O tratamento com benznidazol, embora tenha eliminado a parasitemia em 80% dos pacientes, pareceu não ter influência sobre o desenvolvimento da miocardite (Parada *et al.*, 1997). Outro estudo, que analisou alterações histopatológicas no coração de 39 pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, concluiu que as lesões epicárdicas observadas nesses pacientes foram resultado do dano causado pelo desenvolvimento do processo crônico inflamatório (Benvenuti e Gutierrez, 2007). É importante ressaltar a importância desse processo inflamatório no músculo cardíaco de pacientes com a doença de Chagas, mesmo em pacientes com a forma indeterminada da doença (Lopes *et al.*, 1975).

Na doença de Chagas há também comprometimento autonômico e a gravidade da denervação simpática e parassimpática foi observada quando comparada por técnicas de imunohistoquímica em coração de pacientes chagásicos com cardiopatas de outras etiologias (Machado *et al.*, 2000). Neste trabalho, concluiu-se que o coração do chagásico tem maior quantidade de inflamação e uma maior gravidade e precocidade de denervação autonômica, principalmente parassimpática.

1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

De forma geral, o objetivo do tratamento antiparasitário eficaz seria de promover a regressão das lesões inflamatórias além da diminuição da fibrose cardíaca. É importante salientar que os medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas devem ter efeito sobre as formas amastigotas intracelulares, que são as formas de reprodução do hospedeiro vertebrado (Teixeira *et al.*, 2006).

Nesse contexto, a história da terapia da doença de Chagas pode ser dividida em 3 fases:

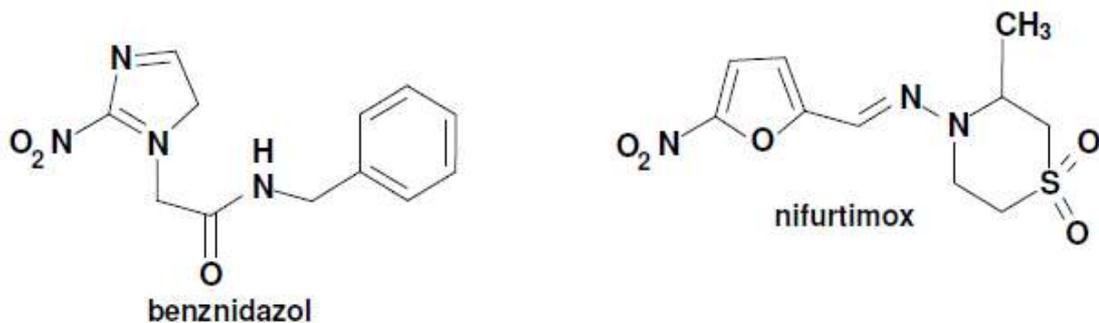
- 1ª fase: Compreende o estágio inicial da descoberta da doença, de 1909 até 1935, e é marcada pela morte de Carlos Chagas (em novembro de 1934) além da publicação do “Manual de Doenças Tropicais e Infectuosas” por Carlos Chagas (Chagas e Chagas, 1935);
- 2ª fase: Período de 1936 a 1960 e corresponde a avaliação biológica de numerosos componentes químicos e extratos de plantas e misturas de componentes, sendo marcada por resultados controversos e de significado clínico não confiável (Krettli e Brener, 1968).
- 3ª fase: Inicia a partir de 1961 com a descoberta de atividade curativa de nitrofuranos em infecções em murinos (Packchianian, 1957) e o tratamento do primeiro caso em humanos. Este tratamento mostrou baixa taxa curativa dos nitrofuranos além da toxicidade o que impediu maiores desenvolvimentos (Coura *et al.*, 1961; Ferreira *et al.*, 1963; Cançado *et al.*, 1964). Foram descritos resultados de mais de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos, dentre os quais se destacam algumas substâncias que tiveram efeito supressivo sobre a infecção causada pelo *T. cruzi*, como o antisséptico violeta de genciana (De Castro, 1993).

No início da década de 1970, as perspectivas melhoraram para o tratamento da doença de Chagas com a introdução do benznidazol e nifurtimox. No entanto, apesar de ambas as drogas terem sido usadas para o tratamento na fase aguda da doença (Cançado, 2002), sua eficácia variava com as áreas geográficas (Yun *et al.*, 2009), provavelmente em consequência da variabilidade genética de cepas do parasito. Neste mesmo período, outros componentes como alopurinol, cetoconazol, itraconazol, todos com atividade anti-*T. cruzi*, foram avaliados em humanos (Gallerano *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 1992; Brener *et al.*, 1993; Apt *et al.*, 1998).

O nifurtimox (3-metil-4(5-nitrofurfurilideno) amino tiomorfolina-1-1-dióxido - Lampit®) e o benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida - Rochagan®) são as duas drogas mais

usadas (FIG 6), porém possuem efeitos tóxicos secundários devido a citotoxicidade. Esse efeito tóxico está principalmente associado à formação de radicais livres intermediários e quimicamente reativos (Marin-Neto *et al.*, 2009; Muratore e Baranchuk, 2010). Além disso, já existem casos de cepas resistentes aos medicamentos na infecção aguda, que requer longos períodos de tratamento (60 dias para o benznidazol e até 90 dias para nifurtimox). Os efeitos colaterais potenciais são erupções cutâneas, náuseas e insuficiência renal e hepática, além de convulsões e outros distúrbios do sistema nervoso que o nifurtimox também pode causar (Clayton, 2010).

FIGURA 6- Estrutura química do benznidazol e nifurtimox



Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652013000300903

A ação tripanocida do nifurtimox deve-se a redução metabólica do grupo nitro gerando radicais nitroânion muito reativos e tóxicos ao parasito (Docampo e Stoppani, 1979). Por outro lado, acredita-se a ação do benznidazol está envolvida com a ligação covalente de seus intermediários nitroreduzidos a vários componentes celulares como DNA, proteínas e lipídios, provocando a inibição do crescimento do parasito (Diaz De Toranzo *et al.*, 1988). A redução dos metabolitos do benznidazol é responsável pelo seu efeito tripanocida, pois se ligam covalentemente a macromoléculas. O benznidazol aumenta a atividade fagocítica e a taxa de morte do parasito através de interferon γ (Romanha *et al.*, 2002) além de inibir a NADH-fumarato redutase do *T. cruzi* (De Castro, 1993). Destas duas drogas, só uma delas é usada no Brasil, o benznidazol, produzido pelo Laboratório Federal de Pernambuco (Fafepe).

1.3.1 Novas estratégias terapêuticas anti *T. cruzi*

Em função da toxicidade ou resistência à terapia clássica, diferentes estudos têm buscado novos alvos terapêuticos para a doença de Chagas. Incluindo mudanças na posologia, introdução de terapia combinativa e até identificação de novos alvos para a quimioterapia. Essas diferentes pesquisas são mostradas no QUADRO 1.

O pesquisador Ricardo Gazzinelli, do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) apresentou recentemente dois tipos possíveis de vacinas contra a doença de Chagas que estão em desenvolvimento: a profilática e a terapêutica. Assim como outras já existentes, a primeira atuaria de forma preventiva, protegendo o organismo contra uma possível infecção. Já a segunda poderia reverter um sério problema que acomete os pacientes: a inflamação cardíaca. Os testes para as vacinas estão em andamento e a próxima etapa envolverá humanos após obedecer aos devidos critérios de segurança (Pereira *et al.*, 2015). Além da vacina, a nanomedicina avança, e estudos recentes demonstram o potencial terapêutico utilizando nanopartículas (Carneiro *et al.*, 2014; Morilla e Romero, 2015; Scalise *et al.*, 2016).

QUADRO 1- Alguns dos alvos terapêuticos pesquisados na substituição ou combinação com a terapia clássica.

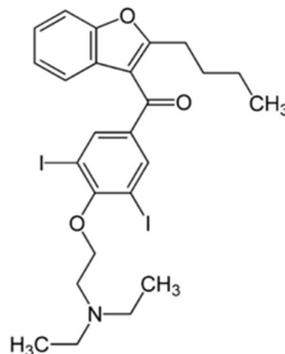
Alvo terapêutico	Informações	Substâncias pesquisadas	Mecanismo de Ação
<i>Tripanotiona/ tripanotiona reductase</i>	Enzima que substitui sistema tio-redox no meio intracelular do parasito.	-clomipramina (Rivarola <i>et al.</i> , 2001) -nitrofurano, naftoquinonas(Maya <i>et al.</i> , 2003)	-Inibição da tripanotiona
<i>Topoisomerase II</i>	Enzima encontrada no núcleo do <i>T. cruzi</i> .	-tarivir, oxoflacin, novobiocina, ácido nalidíxico, -enoxacina e mitoxantrona(Gonzales-Perdomo <i>et al.</i> , 1990; Zuma <i>et al.</i> , 2011)	-Inibição da topoisomerase II
<i>Trans-sialidases</i>	Enzimas que possuem a capacidade de transferir um ácido siálico ligado a uma molécula sialoconjugada do hospedeiro para um receptor apropriado na superfície do parasito, como uma mucina.	-sulfonamida chalcone(Kim <i>et al.</i> , 2009)	-Inibição das trans-sialidases
<i>Cruzipaina</i>	Enzima cisteína protease que tem papel fisiológico para o parasito na nutrição, crescimento, proliferação e diferenciação. Além disso, essa protease auxilia o parasito no papel patogênico como adesão, escape, disseminação e ação imunomodulatória.	-K777 (Cazzulo, 2002; Urbina, Concepcion, <i>et al.</i> , 2003; Doyle <i>et al.</i> , 2007) -quinoxalina-N-acilhidrazona (Romeiro <i>et al.</i> , 2009) -amiodarona (Kennedy <i>et al.</i> , 1996; Bellera <i>et al.</i> , 2013) -clopamizina e benidipina (Sbaraglini <i>et al.</i> , 2016)	-Inibição da cruzipaina
<i>Metabolismo de fosfolípidios</i>	Enzima Carnitina palmitoiltransferase 1(CPT1) participa da via de beta oxidação de ácidos graxos do parasito.	-amiodarona (Kennedy <i>et al.</i> , 1996)	-Inibição da CPT1
<i>Metabolismo do pirofosfato inorgânico (PPi)</i>	Enzima farnesil-pirofosfato sintase tem relação com o metabolismo de (PPi) e tem papel importante para o parasito.	-risedronato, (Garzoni <i>et al.</i> , 2004)	-Inibição da enzima farnesil-pirofosfato sintase
<i>Complexos de rutênio</i>	Fornece óxido nítrico (NO) às células infectadas com o <i>T. cruzi</i>	-abietane diterpendoides, (Olmo <i>et al.</i> , 2015)	-Aumenta a resistência da célula hospedeira

<i>Síntese do ergosterol</i>	O ergosterol é importante para o crescimento, desenvolvimento e proliferação do parasito em todas as fases do ciclo de vida. Enzimas como CYP51(esterol 14 α -dimetilase) , oxidosqualeno ciclase entre outras estão presentes no processo de biossíntese do ergosterol.	-DO870 (Molina <i>et al.</i> , 2001) -miconazol, econazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, posaconazol((Urbina, 2002) -TAK-187 (Urbina, Payares, <i>et al.</i> , 2003) -amiodarona*(Benaim <i>et al.</i> , 2006) -voriconazol (Buckner, 2008) - tipifarnibe (Kraus <i>et al.</i> , 2009) -VNI(Villalta <i>et al.</i> , 2013) -fenarimol(Keenan <i>et al.</i> , 2013)	-Inibição da CYP51 *inibição da oxidosqualeno ciclase
<i>Naturais</i>	Substâncias extraídas na sua maioria de vegetais	-alcalóides de boldo (<i>Peumus boldus</i>) e naftoquinona extraída de <i>Calceolaria sessilis</i> (Morello <i>et al.</i> , 1994) -triterpenos de <i>Arrabidaea triplinervia</i> , diterpenos, comaroviquinona ; terpenóides isolados de <i>Pinus oocarpa</i> (Rubio <i>et al.</i> , 2005; Leite <i>et al.</i> , 2006) -casearina: Guaçatonga (<i>Casearia sylvestris</i>)(Bou <i>et al.</i> , 2014) -helenalina e deidroleucodina(Jimenez <i>et al.</i> , 2014) -moléculas de actinomicina D, bafilomicina B1, cromomicina A3, equinomicina, higrolidina e nonactina (Annang <i>et al.</i> , 2015)	-Diminui cadeia respiratória e resposta ao estresse oxidativo do parasito -induz apoptose
<i>Substâncias a base de Boro</i>	Potente atividade de inibição enzimática	-SCYX-7158, AN4169(Bustamante <i>et al.</i> , 2014)	-Inibição de enzimas
<i>Superóxido dismutase do ferro (Fe-SOD)</i>	Enzima extremamente importante para o <i>T. cruzi</i> na autodefesa contra o estresse oxidativo	-poliamina tetradentato (Piacenza <i>et al.</i> , 2013; Olmo <i>et al.</i> , 2016).	-Inibição da Fe-SOD
<i>Metabolismo de fosfolipídeos</i>	Pode disparar apoptose do parasito quando inibido.	-miltefosina, edelfosina e ilmofofosina (Lira <i>et al.</i> , 2001)	-bloqueia a biossíntese de fosfatidilcolina no parasito

1.3.2 Amiodarona

Amiodarona (FIG 7) foi inicialmente desenvolvida em 1962, sintetizada pelo laboratório Labaz, na Bélgica, usada na Europa como um potente vasodilatador coronariano para o tratamento de angina *pectoris* (Vastesaeger *et al.*, 1967; Singh *et al.*, 1989). No entanto, seu uso como droga antiarrítmica teve início apenas posteriormente (Charlier *et al.*, 1967). É uma droga iodada derivada do benzofurano com estrutura similar aos hormônios da tireóide (T3-triiodotiroxina e T4-tiroxina) (Heger *et al.*, 1984). Sua meia vida é longa e possui grande volume de distribuição (especialmente fazendo estoques no tecido adiposo), meses podem ser requeridos para que o nível sérico da amiodarona se estabilize em concentrações suficientes para que essa droga exerça seu efeito antiarrítmico desejado, quando a mesma é administrada por via oral (Podrid e Kowey, 1996).

FIGURA 7- Estrutura química da Amiodarona.



Fonte: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a047.htm>

Ela é muito usada na fase crônica da doença de Chagas, onde o paciente já possui arritmias devido aos diversos efeitos deletérios do parasito no miocárdio e nodo sinusal. Trata-se de droga antiarrítmica de classe III, dentro da classificação dos antiarrítmicos proposta por *Vaughan-Williams*, cujas ações incluem inibição de canais de potássio, cálcio tipo L, sódio bem como, do trocador sódio-cálcio, além de bloqueio não-competitivo de receptores alfa e beta

adrenérgicos (Podrid e Kowey, 1996; Patel *et al.*, 2009). Exerce ainda, ação removedora de radicais livres e de oxigênio (Agoston *et al.*, 2001), antagonismo dos hormônios tireoidianos (Vassy *et al.*, 2000) e provável efeito vagomimético (Dias Da Silva, Gneccchi-Ruscione, *et al.*, 2002; Dias Da Silva, Viana Publio, *et al.*, 2002).

Em concentrações como antiarrítmico (600mg/dia), a amiodarona pode desencadear vários efeitos colaterais incluindo fotossensibilidade, toxicidade pulmonar, polineuropatia, desconforto gastrointestinal, bradicardia, torsades de pointes (raro), toxicidade hepática, disfunção da tireóide e complicações oculares (Fuster *et al.*, 2006; Rizzioli *et al.*, 2007). No entanto, tais efeitos colaterais podem ser reduzidos com o uso de doses menores deste fármaco (100 a 200mg/dia) (Kim *et al.*, 2014; Park e Kim, 2014).

Em 2006, foi descrito que a amiodarona teria efeito antiparasitário nas infecções por *T. cruzi*, promovendo uma alteração na homeostase dos íons cálcio no parasito pela indução da liberação de íons de reservas intracelulares, especificamente a partir de sua única mitocôndria (Benaim *et al.*, 2006), bem como, a partir dos acidocalcisomas, que são organelas ácidas que contêm altas concentrações de pirofosfato de cálcio (Benaim e Garcia, 2011; Benaim *et al.*, 2012). Além disso, outro efeito observado por Benaim e cols. foi o bloqueio da biossíntese de ergosterol no *T. cruzi* pela inibição da oxidosqualeno ciclase. Esse efeito foi potencializado pelo uso concomitante de posaconazol (Benaim *et al.*, 2006). Ainda, a amiodarona também pode inibir o ciclo do ácido tricarbóxico e carnitina palmitoiltransferase 1(CPT1), pela beta oxidação de ácidos graxos em corações e fígados de ratos sem infecção, além de inibir de maneira dose-dependente a cruzipaina (Kennedy *et al.*, 1996; Bellera *et al.*, 2013).

Um efeito cardioprotetor *in vitro* da amiodarona foi demonstrado por Adesse e colaboradores (2011), onde o uso da amiodarona recuperou a organização fibrilar de actina-F e a distribuição de conexina 43 em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*, associado com a recuperação na contratilidade espontânea, além de erradicação do parasito (Adesse *et al.*, 2011). É importante salientar que o *T. cruzi* rompe ligações das junções gap levando a redução de Conexina 43 que é uma proteína essencial nesse tipo de conexão.

Dessa forma, o tratamento com a amiodarona parece ser uma alternativa promissora no tratamento da doença de Chagas, pois além de melhorar a contratilidade cardíaca (prejudicada nos indivíduos doentes), também parece possuir capacidade anti-*T. cruzi* já que muitos dos seus mecanismos de ação envolvem alvos para pesquisa farmacêutica com atividade tripanocida.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Os dados na literatura referentes ao uso da amiodarona em pacientes com cardiomiopatia chagásica estão principalmente associados à melhora de arritmias cardíacas e morte súbita. No entanto, a ação antiparasitária dessa droga tem sido pouco explorada sendo descrita principalmente em estudos *in vitro*. Sendo assim, é factível acreditar em atividade terapêutica e tripanocida na fase aguda da doença, substituindo ou reduzindo dose de drogas como benznidazol, consequentemente havendo menos efeitos colaterais.

Apesar destas evidências, em sua maioria *in vitro*, pouco se sabe se a amiodarona de fato possui uma ação tripanocida *in vivo*. O estudo de Benaim *et al* (2006) mostrou que a associação da amiodarona com posaconazol foi efetiva em reduzir sensivelmente a parasitemia durante a fase aguda da infecção em camundongos. Porém neste mesmo trabalho, não fica claro se a amiodarona isoladamente tem efeito tripanocida próprio. Para colocar mais dúvida nesta possível ação da amiodarona, um estudo prévio realizado em nosso laboratório, utilizando hamsters em fase crônica de infecção experimental, não demonstrou redução de DNA do parasito após um mês de tratamento com amiodarona (Siqueira, 2012). E mais recentemente, (Carmo *et al.*, 2015) quantificaram o parasito no sangue por meio de PCR quantitativo em amostras de pacientes chagásicos crônicos tratados com a droga. Entretanto, não houve redução dos mesmos comparados com os pacientes não tratados.

O presente estudo foi desenhado para tentar responder esta questão empregando um modelo de camundongos de doença de Chagas usando a cepa Y de *T. cruzi*.

Nossa principal hipótese é que a amiodarona tem efeito tripanocida e efeitos anti-inflamatórios no tecido cardíaco.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Estudar os efeitos da amiodarona na fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da amiodarona administrada durante a fase aguda da doença de Chagas em camundongos em relação:

- a) à parasitemia
- b) ao perfil eletrocardiográfico
- c) à histologia cardíaca
- d) à assinatura genética do parasito

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados 24 camundongos isogênicos da linhagem *Balb/c*, machos, jovens, pesando entre 20-30g, com idade de 6 a 8 semanas provenientes do biotério da Universidade de Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde permaneceram em condições adequadas de temperatura, umidade e disponibilidade de água e alimento *ad libitum*. Esse projeto foi submetido e aprovado no comitê de ética em uso de animais (CEUA) (protocolo número: 374).

O estudo foi constituído de 3 grupos experimentais, divididos conforme Tabela 1.

Tabela 1- Grupos de estudo

08 animais infectados não tratados	CH-NT
08 animais infectados tratados com amiodarona	CH-T
08 animais controle (não infectados)	CO

A amiodarona na dose aproximada de 90 mg/Kg, foi administrada diariamente durante 20 dias com a droga diluída na água, numa concentração média de 0,7 mg/mL. A ingesta da solução água foi mensurada diariamente juntamente com o peso corporal de modo a efetivar correção na concentração da solução ingerida a fim de manter a dose em torno de 90mg/Kg.

4.2 LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO

A linha do tempo do experimento está esquematizada na FIG 8.

FIGURA 8- Linha do tempo utilizada no experimento



4.3 INOCULAÇÃO DO PARASITO

Os animais foram inoculados com 10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y policlonal do parasito via intraperitoneal (Magalhães *et al.*, 1985). Para esse fim, elas foram obtidas do sangue de camundongos Swiss infectados. Após a infecção, os animais foram alojados em gaiolas plásticas, onde tiveram livre acesso à ração (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR) e à água ou solução de amiodarona.

Ambos os animais infectados foram submetidos aos mesmos protocolos experimentais entre o primeiro e o vigésimo primeiro dia pós infecção (fase aguda da infecção), onde foram observados diariamente a fim de se avaliar a parasitemia.

4.4 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA

A parasitemia foi avaliada nos animais infectados a cada dois dias até o vigésimo dia de tratamento. A contagem dos parasitos, foi realizada a fim de realizar uma curva parasitêmica, adaptada a partir da técnica de BRENER e colaboradores (1962). O exame direto a fresco foi realizado colocando-se 5 μ l de sangue, coletado da cauda dos animais, entre lâmina (26 mm x 76 mm) e lamínula (22 mm²), examinando a presença de parasitos em 50 campos, ao microscópio óptico com objetiva de 40x (Brenner, 1962).

4.5 REGISTRO DO ELETROCARDIOGRAMA

Com a finalidade de efetuar o registro eletrocardiográfico os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, via intraperitoneal). Cada animal foi monitorado por 3 minutos em dois momentos distintos: no dia zero, antes do inoculo (ECG1) e no vigésimo primeiro dia (ECG2) pós infecção.

O registro eletrocardiográfico foi realizado utilizando-se um amplificador de alto ganho (Bioelectric Amplifier, model 8811A, Hewlett-Packard Med. Inst., Whaltam, MA, USA) e um sistema de aquisição de dados (placa de conversão analógico-digital, modelo DI-720-USB, Dataq Instr. Inc. Akron, OH, USA) acoplados a um computador pessoal. Pequenos eletrodos em agulha foram conectados ao animal segundo o padrão estabelecido para obtenção das derivações clássicas (D1, D2, D3, aVR, aVL, aVF). As derivações precordiais foram as seguintes: VA = eletrodo colocado no 4^o espaço intercostal direito sobre a linha hemiclavicular; VB = eletrodo no 5^o espaço intercostal esquerdo na linha hemiclavicular; VC = eletrodo no 5^o espaço intercostal esquerdo na linha axilar anterior (Bestetti *et al.*, 1987; Bestetti e Oliveira, 1988). A frequência de aquisição de sinal foi de 3000 Hz. Os sinais coletados do ECG foram armazenados em computador para posterior análise.

As seguintes variáveis dos ECGs expressas em milisegundos foram medidas por computador:

- a) duração do intervalo RR (iRR) em D2;
- b) duração da onda P (dP) em D2, D3, aVF e VB;
- c) duração do intervalo PR (iPR) em VB;
- d) duração do complexo QRS (dQRS) em todas as derivações;
- e) duração do intervalo QaT (iQaT) e
- f) duração do intervalo QaT corrigido segundo a equação de Bazett [$iQaTc = iQaT/\text{raiz}(iRR)$].

Os cálculos de duração dos parâmetros eletrocardiográficos foram realizados a partir da tela do computador empregando-se o software Windaq-Pro+ (Dataq Instr. Inc. Akron, OH, USA). Além destes parâmetros, também foram analisados por inspeção do traçado na tela do computador a presença de arritmias cardíacas, bloqueios átrio-ventriculares e intra-ventriculares e outras alterações.

4.6 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

4.6.1 Coleta de tecidos

Após o registro de ECG no 21º dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical afim de minimizar o sofrimento, e em seguida o coração foi coletado. Para esse fim, os animais foram colocados individualmente na posição anatômica em decúbito dorsal sobre um tablado cirúrgico (35cm x 25cm), e após a fixação dos membros, foi realizada uma assepsia com etanol a 70% por toda superfície ventral do camundongo. Utilizando pinça “dente de rato” e uma tesoura de ponta fina, foi realizado uma incisão vertical de 10 cm na parte torácica do animal, de forma que coração ficasse exposto facilitando sua remoção. O material cirúrgico utilizado (tesouras, pinças e bisturi) foi esterilizado antes do procedimento e as lâminas de bisturi substituídas a cada animal. Após a remoção, o coração foi lavado com solução fisiológica estéril 0,9% e subdivididos em duas partes: a primeira foi devidamente armazenada e estocada a -80°C

para posterior detecção de parasitos pela PCR e a outra, fixada em formol tamponado a 10% para a avaliação histopatológica por meio de coloração com hematoxilina e eosina.

4.6.2 Histopatologia

Após a fixação em formol tamponado a 10%, os fragmentos teciduais foram processados no Laboratório de Histologia do campus I da UFTM. Os tecidos foram separados e desidratados em etanol P.A por 24h, diafanizados em xilol (P.A) e incluídos em parafina líquida. Na sequência, foram realizados cortes de 5µm de espessura em micrótomo de navalha e os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para identificação de ninhos do *T. cruzi* e avaliação dos processos inflamatórios (Behmer, 1976; Bancroft e Cook, 1994). O número de ninhos de amastigotas e os infiltrados inflamatórios foram determinados por meio de microscopia óptica de campo claro (modelo Axio Observer Z1, Carl Zeiss Inc, Germany).

Os critérios de classificação do grau de inflamação (miocardite atrial, ventricular e epicardite) estão mostrado na Tabela 2. Além disso, foi avaliado o parasitismo tecidual (presença de ninhos de amastigotas de *T. cruzi*). Considerou-se como (+++), obtendo “score” de 3 pontos os cortes em que de 51 a 100% dos campos apresentaram-se com processo inflamatório, (++) com “score” de 2 pontos os cortes onde de 26 a 50% dos campos apresentaram-se com processo inflamatório, (+) com “score” de 1 ponto quando forem encontrados até 25% dos campos com processo inflamatório (Chapadeiro *et al.*, 1988).

Um valor global de inflamação (“score” total) foi calculado pela soma das pontuações da miocardite atrial, ventricular e epicardite.

Tabela 2- Classificação da intensidade do processo inflamatório em cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina.

Classificação da intensidade da inflamação	Representação	“Score” (Pontuação)
Leve	+	1 ponto
Moderado	++	2 pontos
Intenso	+++	3 pontos

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA DOS TECIDOS

A presença do *T. cruzi* no coração também foi detectada pela PCR específica, e a caracterização das populações do parasito pela *Low Stringency Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction* (LSSP-PCR). As metades do coração de cada animal foi transferida para recortes de plástico transparente (7 cm²), com espessura de 3 mm, higienizados com gases estéreis umedecidas em etanol 70% e radiação UV por 15 minutos.

Os tecidos cardíacos foram picotados individualmente utilizando lâminas de bisturi e palitos de madeira estéreis, e transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. A extração de DNA foi realizada pelo método da lise alcalina, acrescentando NaOH (50 mM) e 30 µL de óleo mineral em cada tubo, levando-os ao vórtex e fervendo por 15min. Logo, foram neutralizados com Tris-HCl (130 mM, pH 8,0) com agitação em vórtex e centrifugação à 5376xg por 20 segundos. A fase intermediária observada em cada tubo após a centrifugação foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL e diluída 1:5 (40 µL de água milli-Q estéril e 10 µL de DNA) e armazenada à -20° C até sua utilização nas reações de PCR (Vago *et al.*, 2000).

4.8 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi*

4.8.1 Amplificação específica

Um fragmento de 330 pb foi amplificado com os seguintes iniciadores, dirigidos para a região constante dos minicírculos do kDNA (Wincker *et al.*, 1994):

Iniciador 121 (5'- AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA-3')

Iniciador 122 (5' GGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3').

A PCR foi realizada num volume final de 20µL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 3,5 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Cenbiot, Ludwig Biotecnologia Ltda), 20 pmol de cada iniciador (121 e 122), 2 µL de DNA e 30 µL de óleo mineral (Gomes *et al.*, 1998).

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C (5 minutos) e 35 ciclos com desnaturação a 95°C (1 minuto), anelamento a 65°C (1 minuto) e extensão a 72°C (1 minuto), seguida de extensão final de 10 minutos, em um termociclador MJ Research PTC-100.

4.8.2 LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction*)

A técnica de LSSP-PCR é um método sensível para estudar os polimorfismos do kDNA do parasito, na qual as regiões de 330pb do kDNA previamente amplificado servem como um molde para uma segunda reação de PCR, utilizando um único iniciador para tal, sob baixas condições de estringência (Pena *et al.*, 1994; Vago *et al.*, 1996). O produto da PCR correspondente à amplificação específica da região variável do kDNA do *T. cruzi* foi purificado em gel de agarose 1,5% (1,0% agarose comum e 0,5% agarose low melting) em TBE 1X (89mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,0) preparado com água bidestilada estéril, em presença de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As bandas de 330pb foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta de comprimento de onda longo, e coletado com auxílio de um bisturi estéril. Após aquecimento em

banho de água fervente, as amostras foram homogeneizadas e diluídas 1:10 com água milli-Q estéril, sendo então, utilizadas como DNA molde para as reações de LSSP-PCR (Vago *et al.*, 1996; Vago *et al.*, 2000). Como essa reação é realizada com um único iniciador específico, utilizado sob condições de baixa estrigência, todos os experimentos devem ser executados de modo a evitar qualquer tipo de contaminação química e bacteriológica (Pena *et al.*, 1994; Barreto *et al.*, 1996).

Desta maneira, alguns cuidados foram tomados:

- Desinfecção da cuba de eletroforese com HCl 0,25M e NaOH 0,5M (30 minutos cada enxaguando com água bidestilada estéril);
- Exposição de todo material utilizado (cuba de eletroforese, pipetas, ponteiros, etc.) a radiação ultravioleta (30 minutos);
- Aplicação do DNA no gel de agarose de forma intercalada entre canaleta vazia e com amostra.

A reação de LSSP-PCR foi realizada utilizando-se o iniciador S35G (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATG-3'). A mistura da reação teve um volume final de 22µL 44 contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase, 45pmol do iniciador e 4µL de DNA (fragmento de 330pb purificado em agarose e diluído 1:10) e 30µL de óleo mineral. A amplificação foi realizada com 40 ciclos abrangendo desnaturação a 94°C (1min), anelamento a 30°C (1min) e extensão a 72°C (1min), precedidos de desnaturação inicial a 94°C (5min).

Após os 40 ciclos foi realizada uma extensão adicional a 72°C durante 7 minutos. Os produtos de LSSP-PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, corados pela prata, gerando um perfil composto por múltiplas bandas. A análise dos perfis obtidos reflete a sequência de nucleotídeos do DNA usado como molde, compondo sua "assinatura gênica" (Pena *et al.*, 1994). A análise dos perfis de "assinaturas gênicas" das amostras de *T. cruzi*, obtidas pela reação de LSSP-PCR, foi realizada visualmente em foto digitalizada do gel, onde os padrões de bandas foram marcados, e submetidos à análise de proporção de bandas compartilhadas entre as cepas e a construção de fenogramas com o software GelComparII (Applied Maths NV).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas foram avaliadas quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e foram consideradas paramétricas apenas quando a distribuição foi normal e a variância homogênea, sendo expressas como média \pm erro padrão da média. Na ausência de distribuição normal e/ou variância homogênea, as variáveis foram expressas como mediana e intervalo interquartil.

Na avaliação das curvas de parasitemia empregou-se o teste paramétrico ANOVA de dois fatores (grupo x tempo) para medidas repetidas seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os parâmetros eletrocardiográficos foram avaliados pela ANOVA de um fator seguido do teste de Tukey ou pela ANOVA de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, quando apropriados. Comparações entre os parâmetros eletrocardiográficos ante e 21 dias depois foram efetuadas pelo teste t pareado ou de Wilcoxon, quando apropriados. As demais comparações entre os grupos infectados tratados ou não com amiodarona foram efetuadas empregando-se o teste t de “Student” para medidas independentes ou o teste de Mann-Whitney, quando apropriados. Proporções de animais com presença de ninhos de amastigotas foi comparada pelo teste exato de Fisher.

As análises estatísticas foram realizadas considerando significativos os valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o software Sigmastat 2.0.3 (SPSS corp.).

A análise comparativa dos perfis genéticos obtidos pela técnica de LSSP-PCR foi realizada pelo *software* Gel Compar II (Applied Maths NV), o qual utiliza o método da média aritmética não ponderada - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Analysis*) para construção dos fenogramas.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 INGESTÃO DIÁRIA DE AMIODARONA

A ingesta diária média de amiodarona no grupo CH-T foi de $92,9 \pm 4,2$ mg/Kg/dia.

5.2 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PARASITÁRIA NA FASE AGUDA

A partir do segundo dia pós-infecção, a parasitemia foi acompanhada pelo método de Brener (1962) para determinar a infectividade nos animais pelo *T. cruzi*. Em todos os camundongos infectados observou-se e contou-se, mediante o exame direto a fresco, o número de parasitos ao longo de 20 dias pós-infecção durante a fase aguda. As curvas parasitêmicas não evidenciaram diferenças significativas ao longo da fase aguda ($p=0,470$) (FIG 9).

A área sob a curva do grupo CH-NT foi de $38,3 \pm 8,3$ milhões/mL.dia versus $26,8 \pm 4,1$ milhões/mL.dia do grupo CH-T, onde $p=0,232$ (não significativo) (FIG 10). O valor de pico de parasitemia de cada animal observado entre o sétimo e décimo terceiro dia também não diferiu entre os grupos ($12,6 \pm 1,6$ milhões/mL no grupo CH-NT versus $7,0 \pm 1,6$ milhões no grupo CH-T, onde $p=0,190$ (não significativo). Da mesma forma, os valores de parasitemia no sétimo dia, onde a maioria dos animais tiveram o pico de parasitemia, não diferiram entre os dois grupos ($12,2 \pm 3,9$ milhões/mL no grupo CH-NT versus $5,1 \pm 1,9$ milhões no grupo CH-T, onde $p=0,195$ (não significativo).

FIGURA 9- Curvas parasitêmicas (expressas em milhões de parasitas/mL \pm erro padrão da média) realizadas nos diferentes dias de análise nos dois grupos estudados: grupo infectado não tratado (CH-NT) e grupo infectado tratado com amiodarona (CH-T). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi notada ($p=0,470$ para o efeito tratamento no teste de ANOVA de dois fatores para medidas repetidas)

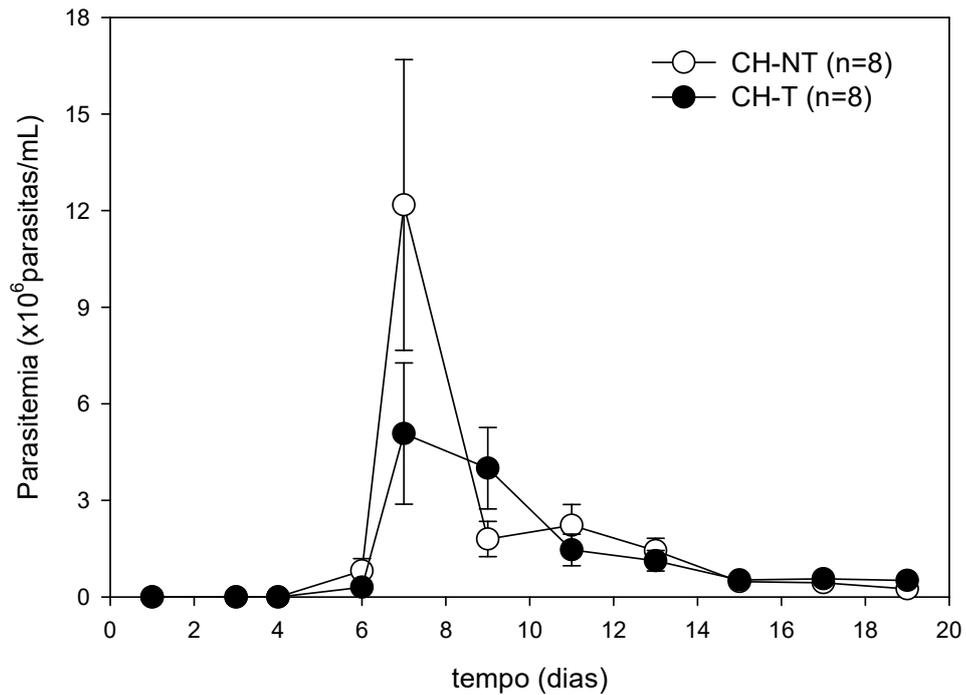
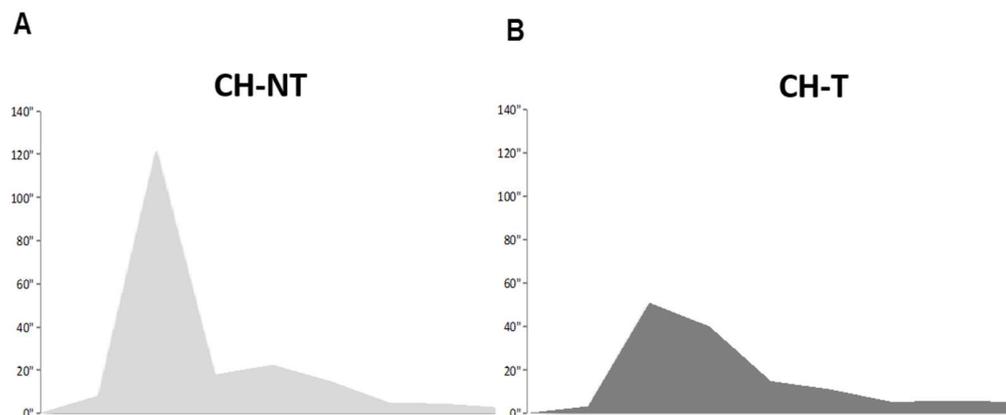


FIGURA 10 - Área sob a curva média dos animais infectados tratados ou não com amiodarona, A área sob a curva média do grupo dos (A) animais infectados e não tratados (CH-NT) foi de $38,3 \pm 8,3$ milhões/mL.dia versus $26,8 \pm 4,1$ milhões/mL.dia do grupo (B) de animais infectados tratados com amiodarona (CH-T), onde $p=0,232$ no teste t (não significativo).



5. 3 ANÁLISE DO ELETROCARDIOGRAMA

As tabelas a seguir mostram os valores médios (\pm erro padrão da média) de todos os parâmetros eletrocardiográficos comparados entre grupos experimentais em dois diferentes momentos do experimento: no dia da infecção e 21 dias após a infecção.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados do primeiro registro eletrocardiográfico (ECG1) realizado nos camundongos antes de serem submetidos ao experimento. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ao analisarmos os diversos parâmetros entre os três diferentes grupos previamente à infecção.

Tabela 3. Análise do eletrocardiograma antes da infecção dos animais controles não infectados (CO), infectados não tratados (CH-NT) e infectados tratados com amiodarona (CH-T) antes do inoculo. Os parâmetros eletrocardiográficos estão expressos como média \pm erro padrão de média (EPM).

	CO (n=8)	CH-NT (n=8)	CH-T (n=8)	<i>p</i>
iRR (ms)	141,05 \pm 3,98	131,01 \pm 8,61	138,47 \pm 7,48	0,580
FC (bpm)	427,65 \pm 11,52	472,51 \pm 31,99	443,14 \pm 26,33	0,445
dP (ms)	10,34 \pm 0,45	8,81 \pm 0,62	10,77 \pm 0,21	0,160
iPR (ms)	30,78 \pm 0,38	31,32 \pm 1,59	31,96 \pm 0,91	0,613
dQRS (ms)	9,84 \pm 0,30	11,17 \pm 0,25	10,88 \pm 0,35	0,130
iQaT (ms)	12,52 \pm 0,35	13,53 \pm 0,24	14,17 \pm 0,43	0,100
iQaTc (ms ^{1/2})	1,12 \pm 0,04	1,19 \pm 0,04	1,21 \pm 0,04	0,257

iRR = intervalo RR; FC = frequência cardíaca; dP = duração da onda P; iPR = intervalo PR; dQRS = duração do complexo QRS; iQaT = duração do intervalo QT; iQaTc = intervalo QT corrigido pela equação de Bazett. (ms=milissegundos; bpm= batimentos por minuto). *p* = valor de probabilidade de acordo com o teste ANOVA one way ou ANOVA de Kruskal-Wallis, quando apropriado. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os diferentes grupos.

Na tabela 4 encontram-se os resultados do segundo registro eletrocardiográfico (ECG2) realizado 21 dias após o inoculo. Observou-se um aumento significativo da duração do QRS e dos intervalos QT absoluto e corrigido nos animais infectados não tratados (CH-NT) em comparação aos animais controles (CO) e em comparação aos valores iniciais antes do inoculo. Após 21 dias de infecção, os animais infectados tratados com amiodarona (CH-T) apresentaram uma duração do QRS significativamente menor que os animais infectados não tratados. Os demais parâmetros não sofreram modificações significativas. Em adição, nenhuma arritmia cardíaca supraventricular ou ventricular foi percebida durante o exame eletrocardiográfico convencional.

Tabela 4. Análise do eletrocardiograma final registrado 21 dias depois do inoculo nos animais controles (CO), infectados não tratados (CH-NT) e infectados tratados com amiodarona (CH-T). Os parâmetros eletrocardiográficos estão expressos como média \pm erro padrão de média (EPM).

	CO (n=8)	CH-NT (n=8)	CH-T (n=8)	<i>p</i>
iRR (ms)	126,47 \pm 7,85	154,00 \pm 10,87	135,34 \pm 6,45	0,059
FC (bpm)	485,25 \pm 29,52	398,56 \pm 21,18	449,00 \pm 19,90	0,059
dP (ms)	11,26 \pm 0,53	11,03 \pm 0,82	10,18 \pm 0,60	0,489
iPR (ms)	30,17 \pm 1,20	32,69 \pm 1,61	29,94 \pm 1,40	0,332
dQRS (ms)	10,10 \pm 0,31	12,82 \pm 0,59 * $\&$	10,78 \pm 0,49 #	0,002
iQaT (ms)	12,31 \pm 0,22	18,50 \pm 2,60 * $\&$	14,61 \pm 0,78	0,003
iQaTc (ms ^{1/2})	1,10 \pm 0,04	1,51 \pm 0,22 * $\&$	1,26 \pm 0,05	0,030

iRR = intervalo RR; FC = frequência cardíaca; dP = duração da onda P; iPR = intervalo PR; dQRS = duração do complexo QRS; iQaT = duração do intervalo QT; iQaTc = intervalo QT corrigido pela equação de Bazett. (ms=milissegundos; s= segundos). *p* = valor de probabilidade de acordo com o teste ANOVA “one way” ou ANOVA de Kruskal-Wallis, quando apropriado. * *p*<0,05 versus grupo CO de acordo com teste de Tukey ou de Dunn, quando apropriado. # *p*<0,05 versus grupo CH-NT de acordo com o teste de Tukey ou Dunn, quando apropriado. $\&$ *p*<0,05 versus mesmo grupo antes do inoculo de acordo com teste de t pareado ou de Wilcoxon, quando apropriado.

5.4 ANÁLISE DA HISTOLOGIA DO CORAÇÃO

O estudo histopatológico do coração mostrou ninhos de amastigotas eventuais e infiltrado inflamatório nos átrios, ventrículos e superfície epicárdica de leve a moderada intensidade em ambos os grupos infectados. Ninhos de parasitos foram vistos em 3 dos 8 (37,5%) animais infectados não tratados e em 4 dos 8 (50%) animais infectados tratados com amiodarona, não havendo diferença significativa nestas proporções entre os dois grupos ($p=1,000$ no teste exato de Fisher). E a contagem média de ninhos encontrados nos corações também não foi diferente: $2,0 \pm 1,0$ no grupo CH-NT versus $1,5 \pm 0,3$ no grupo CH-T ($p=0,604$ no teste t).

As intensidades do infiltrado inflamatório nas diferentes regiões do coração, bem como a contagem de ninhos de parasito para cada animal individual e os “Scores” totais estão mostradas nas tabelas 5 e 6, abaixo.

Tabela 5. Pontuações atribuídas ao infiltrado inflamatório em diferentes regiões do coração e contagem de ninhos de parasito de cada animal do grupo infectado não tratado (CH-NT).

Animal	Miocardite atrial	Miocardite ventricular	Pericardite	“Score” total (pontos)	Ninhos
1	+	+	+	3	4
2	++	+	++	5	1
3	++	++	++	6	
4	++	+	++	5	
5	++	++	++	6	
6	+	+	++	4	
7	++	+	++	5	1
8	+++	+	++	6	

+ = infiltrado inflamatório leve; ++ = infiltrado inflamatório moderado; +++ = infiltrado inflamatório intenso

Tabela 6. Pontuações atribuídas ao infiltrado inflamatório em diferentes regiões do coração e contagem de ninhos de parasito de cada animal do grupo infectado tratado com amiodarona. (CH-T).

Animal	Miocardite atrial	Miocardite ventricular	Pericardite	“Score” total (pontos)	Ninhos
1	++	+	+	4	
2	++	+	++	5	
3	++	+	+	4	2
4	++	++	+	5	
5	++	+	++	5	
6	++	++	+	5	2
7	+	+	+	3	1
8	++	++	+	5	1

+ = infiltrado inflamatório leve; ++ = infiltrado inflamatório moderado; +++ = infiltrado inflamatório intenso

A análise dos resultados medianos (e intervalo interquartil) dos infiltrados inflamatórios atriais, ventriculares e epicárdicos está mostrada na tabela 7. Note a diferença significativa entre os dois grupos infectados tratados ou não com amiodarona apenas para a epicardite, que se mostrou mais leve nos animais tratados com amiodarona (Tabela 7). O “score” total do infiltrado inflamatório, resultante da soma das pontuações dos infiltrados inflamatórios nos átrios, ventrículos e epicárdio, não diferiu entre os grupos (Tabela 7). No grupo controle não foi encontrado processo inflamatório em nenhum dos animais. A FIG 11 mostra imagens histológicas de infiltrados inflamatórios no coração de animais representativos dos grupos estudados.

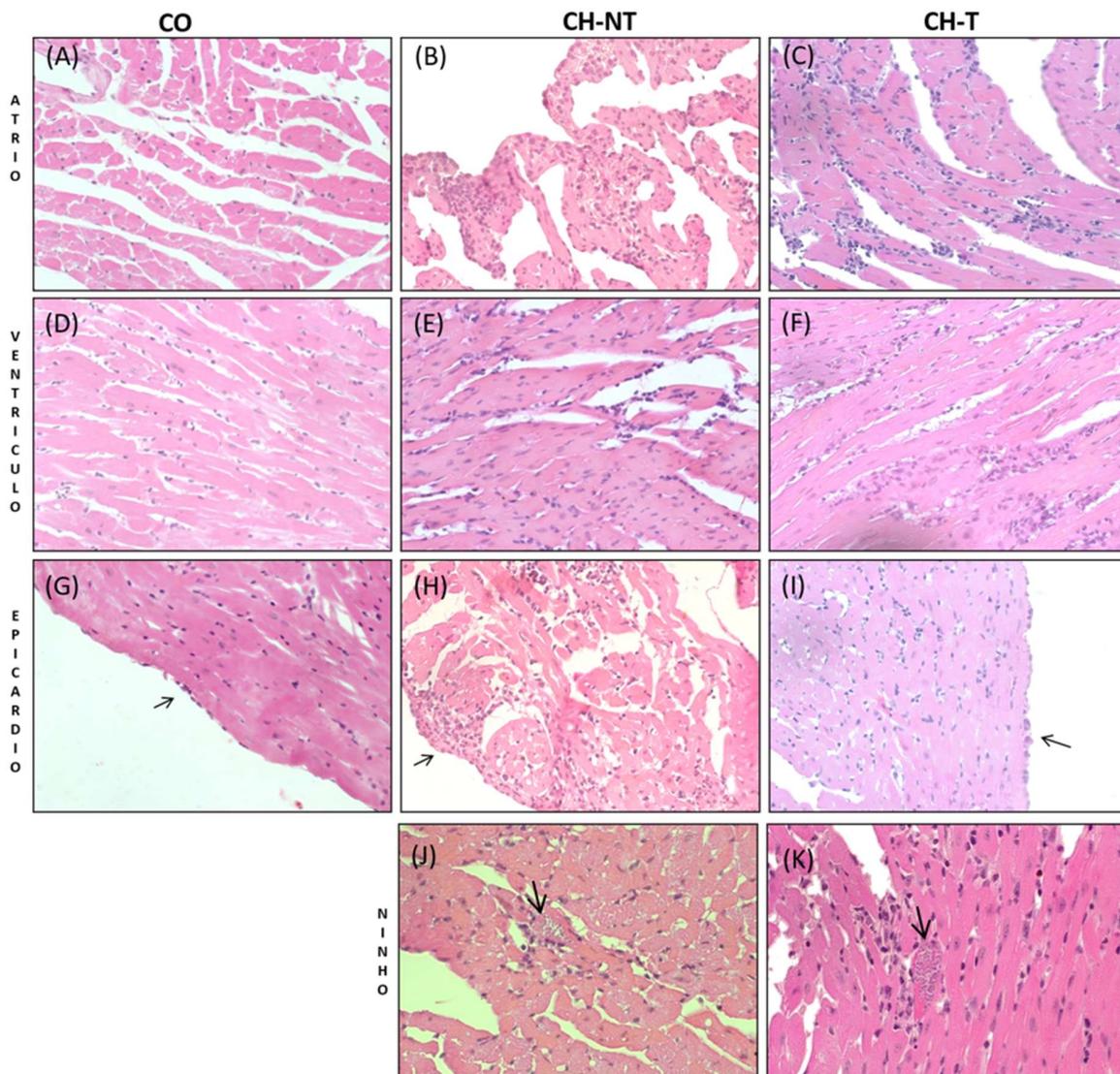
Tabela 7: Valores medianos (e intervalo interquartil) das pontuações para miocardite atrial, miocardite ventricular e epicardite, bem como o “score” global dos animais controles (CO), infectados não tratados (CH-NT) e infectados tratados com amiodarona (CH-T).

	CO (n=8)	CH-NT (n=8)	CH-T (n=8)	<i>p</i>
Miocardite atrial	0,0 (0,0)	2,0 (1,0)	2,0 (0,0)	0,645
Miocardite ventricular	0,0 (0,0)	1,0 (0,5)	1,0 (1,0)	0,721
Epicardite	0,0 (0,0)	2,0 (0,0)	1,0 (0,5) #	0,038
Score global	0,0 (0,0)	5,0 (1,0)	5,0 (1,0)	0,382

p = valor de probabilidade de acordo com o teste de Mann-Whitney entre os grupos CH-NT e CH-T.

$p < 0.05$ versus grupo CH-NT.

FIGURA 11- Fotomicrografias de luz comum coradas pelo HE, de cortes teciduais cardíacos atriais (painéis superiores A, B e C), ventriculares (painéis centrais D, E e F) e de epicárdio (painéis inferiores G, H e I) de animais representativos dos grupos controle (painéis A, D e G), infectado não tratado (painéis B, E e H) e infectado tratado com amiodarona (painéis C, F e I). Setas nos painéis inferiores indicam a região epicárdica. Aumento de 400x em todos os painéis. (J) ninho de amastigota (seta) no miocárdio atrial de um animal infectado não tratado. (K) ninho de amastigota (seta) no miocárdio ventricular de uma animal infectado e tratado com amiodarona. Aumento de 630x.

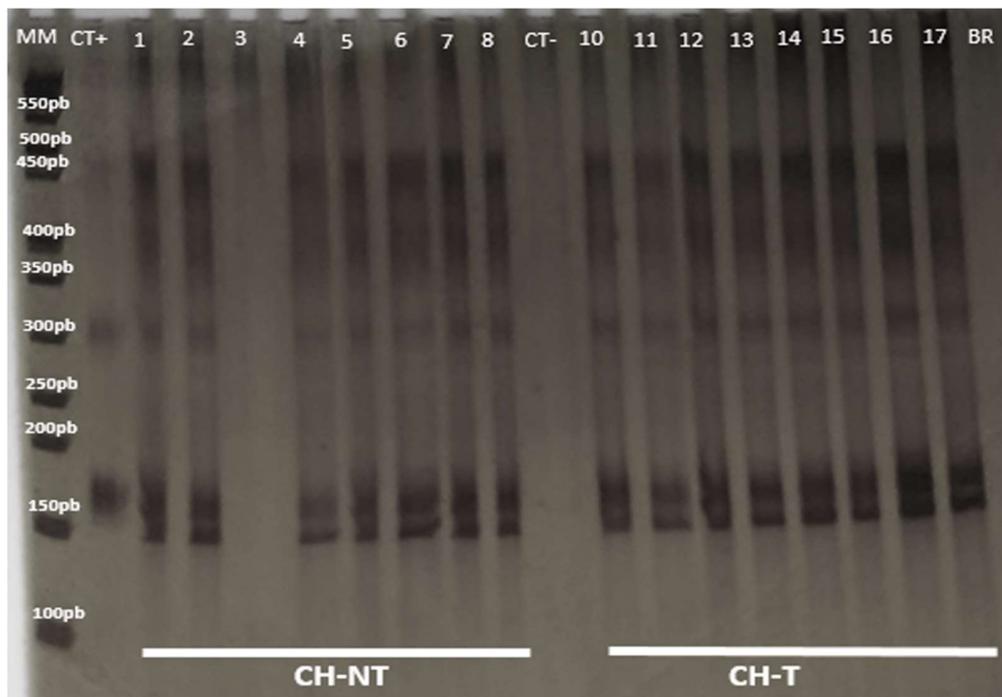


5.5 AVALIAÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

5.5.1 Presença do parasito por PCR especifica

A análise do parasitismo tecidual dos camundongos infectados foi realizada pela amplificação do kDNA do parasito pela PCR especifica para identificação de *T. cruzi* no coração (FIG 12). A presença do parasito foi evidenciada pela PCR, que detectou positividade em todos os animais avaliados em ambos os grupos infectados tratados ou não com amiodarona.

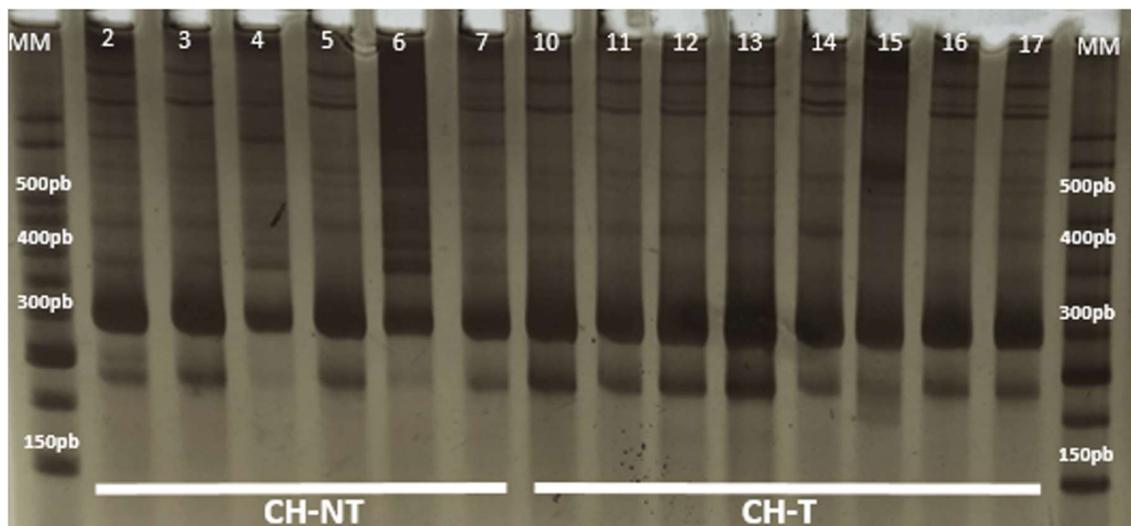
FIGURA 12- Gel representativo de produtos da reação de PCR de tecidos cardíacos utilizando iniciadores 121-122 após amplificação em gel de poliacrilamida a 7,5% dos animais infectados não tratados (CH-NT) e dos animais infectados tratados com amiodarona (CH-T). CT+: controle positivo, CT-: controle negativo, MM: marcador molecular, BR: branco



5.5.2 Variabilidade do kDNA nos grupos de infecção pela técnica de LSSP-PCR

Os polimorfismos da região hipervariável dos minicírculos do kDNA das populações do *T. cruzi* presentes no tecido dos animais infectados, durante a fase aguda da infecção, foram caracterizadas geneticamente pela reação de LSSP-PCR (FIG 13).

FIGURA 13- Gel representativo de produtos da reação de LSSP-PCR dos tecidos cardíacos, utilizando o iniciador S35G, após amplificação em gel de poliacrilamida a 7,5%, dos animais infectados não tratados (CH-NT) e dos animais infectados tratados com amiodarona (CH-T). MM: marcador de peso molecular.

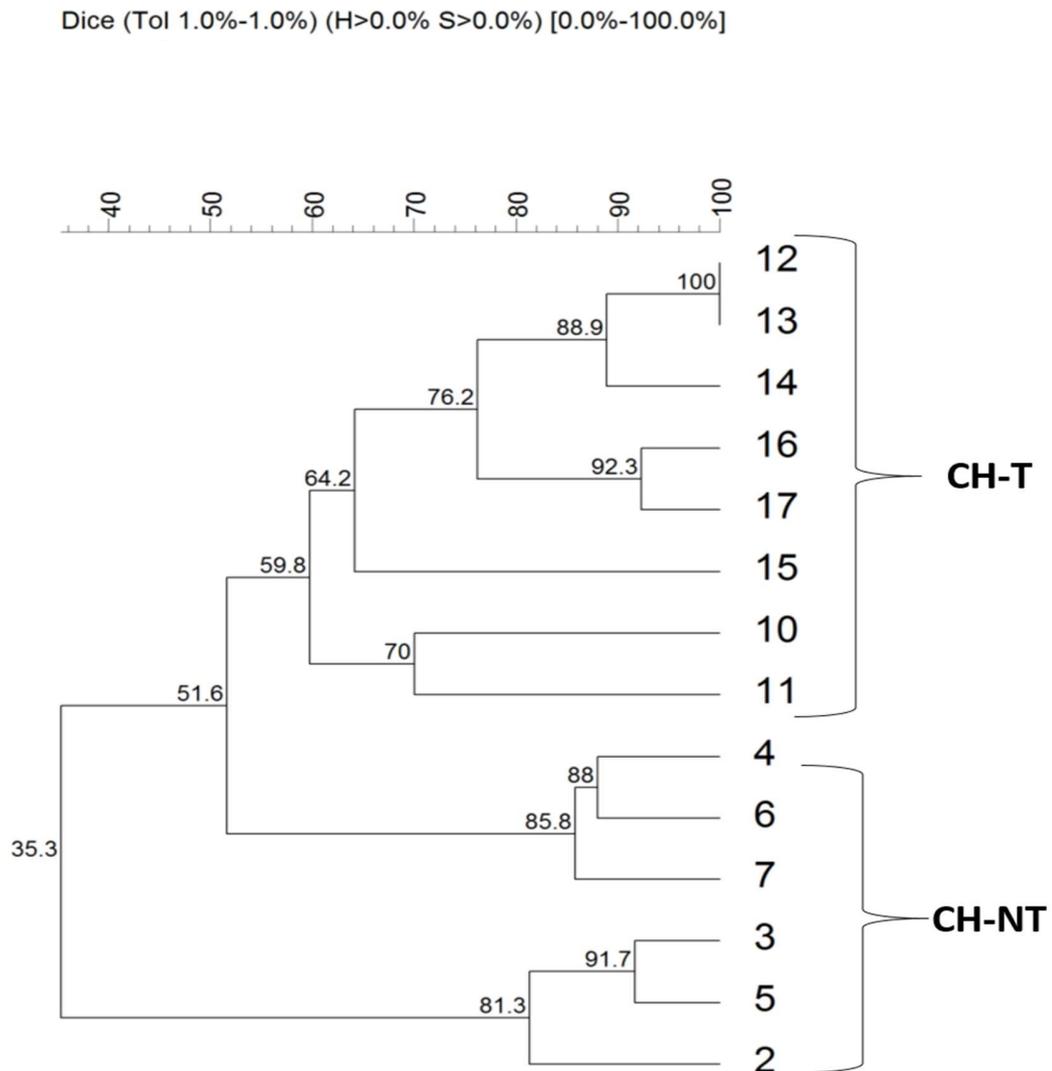


Os perfis de bandas gerados pela LSSP-PCR do kDNA das amostras de tecido cardíaco obtidas dos animais com infecção aguda (20 dias) foram avaliados a fim de identificar os perfis genéticos das populações do *Trypanosoma cruzi* presentes nos corações.

No fenograma dos perfis de LSSP-PCR das amostras de tecido cardíaco obtidas de animais infectados; houve separação de braços distintos, onde podemos observar uma certa variação genética dos parasitos, a qual foi notoriamente influenciada pelo tratamento com amiodarona (FIG 14).

No braço relativo aos animais infectados e tratados com amiodarona (10 ao 17) (CH-T), observa-se que a população se dividiu em 5 grupos com similaridade genética entre eles de 59,8 a 100%. Já no braço relativo aos animais infectados não tratados (2 ao 7) (CH-NT), observa-se que a população se dividiu em 4 grupos com similaridade genética entre eles de 85,8 a 91,7 %.

FIGURA 14- Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR no coração de animais infectados tratados e não tratados com amiodarona coletado após 21 dias de infecção. Animais 2, 3, 4,5, 6 e 7 são os animais infectados não tratados (CH-NT) e os animais 10,11,12,13,14,15,16 e 17 são os animais infectados tratados com amiodarona(CH-T).



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos da amiodarona na fase aguda na doença de Chagas experimental em camundongos. Ainda que uma menor influência sobre a parasitemia tenha sido observada, nossos dados mostram uma redução no processo inflamatório epicárdico acompanhado de uma melhora dos parâmetros eletrocardiográficos nos camundongos tratados. Tais achados foram também associados a modificações na assinatura genética do parasito, sugerindo uma ação da amiodarona seletiva sobre os diferentes clones do parasito presentes no tecido cardíaco.

As curvas parasitêmicas apresentadas neste estudo mostram um processo de proliferação do parasito e circulação sistêmica do mesmo bastante intenso, atingindo contagens muito elevadas após uma semana da infecção (cerca de 12 milhões de formas tripomastigotas/mL de sangue nos animais não tratados com amiodarona e cerca de 5 milhões de formas tripomastigotas/mL de sangue nos animais tratados com amiodarona). Após o sétimo dia de infecção as contagens sanguíneas caem, atingindo valores bem inferiores por ocasião da eutanásia dos animais para realização do estudo anátomo-patológico. Este comportamento aqui observado em camundongos Balb/c é similar aos vários trabalhos encontrados na literatura em que estes animais foram estudados com diferentes cepas de *T. cruzi* (Morales et al., 1987; Cabeza Meckert et al., 1988; Motran et al., 1998).

Ainda que a curva de parasitemia, a área sob a curva e o pico de parasitemia tenham sido numericamente menores no grupo infectado e tratado com amiodarona, estes parâmetros não se mostraram significativamente diferentes, provavelmente pela grande variação inter-individual nos valores amostrados. Indo ao encontro dos dados de parasitemia, nós também não notamos nenhuma diferença estatisticamente significativa no percentual de animais com corações positivos para ninhos de amastigotas, bem como na contagem média de ninhos de amastigotas por lâmina. Por fim, os dados qualitativos do PCR convencional mostraram presença de DNA do parasita em todos os animais infectados, independente do tratamento ou não com amiodarona.

Desta forma, nosso trabalho não confirma os resultados obtidos por Benaim *et al.* (2006), onde houve a diminuição na parasitemia comparada aos animais infectados e não tratados. Porém neste trabalho de Benaim *et al.* (2006) não foi apresentada análise estatística desta diminuição. Em concordância com os nossos resultados, ao avaliar os efeitos da amiodarona

durante a fase crônica da doença de Chagas cardíaca, Siqueira (2012) também não encontrou nenhuma evidência da redução de carga parasitária tecidual por meio de PCR convencional no coração de *hamsters* infectados. Por fim, trabalho recente de Carmo *et al.* (2015), em pacientes chagásicos cardiopatas crônicos em uso da amiodarona para o tratamento de arritmias cardíacas, também não conseguiu mostrar qualquer redução na carga parasitária sanguínea avaliada por PCR quantitativo. Tomados em conjunto nossos resultados, aliados aos de Siqueira (2012) e Carmo *et al.* (2015) parecem contradizer os resultados de Benaim *et al.* (2006). As razões para esta discordância não são conhecidas e podem envolver diferenças nas cepas de parasitos utilizados. Estudos futuros adicionais com emprego de número maior de animais e talvez em doses maiores de amiodarona fazem-se necessários para esclarecer se a amiodarona possui de fato ação tripanocida sistêmica *in vivo*. Esta necessidade é reforçada particularmente pelos resultados de estudos *in vitro* que têm mostrado em anos recentes o potencial da amiodarona em modificar a homeostase intracelular de cálcio e a síntese de ergosterol essencial para a integridade das membranas celulares do parasito (Benaim *et al.*, 2006).

Apesar da sugerida ausência de ação sobre a parasitemia, a amiodarona apresenta efeitos benéficos sobre o coração, tanto sobre a função elétrica avaliada pelo ECG, quanto sobre a estrutura tecidual, avaliada pelo estudo anátomo-patológico microscópico.

O eletrocardiograma dos animais infectados não tratados evidenciou um aumento da duração do complexo QRS associado à elevação do intervalo QT absoluto e corrigido pelo intervalo RR (pela fórmula de Bazett). Tais achados são concordantes com vários relatos da literatura em camundongos (Gobbi *et al.*, 2007; Eickhoff *et al.*, 2010; Alvarado-Tapias *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012; Strauss *et al.*, 2013; Daliry *et al.*, 2014) e indicam lesão do sistema de condução intraventricular alongando o complexo QRS e alterações na repolarização ventricular (aumento do intervalo QT) decorrente de inflamação e/ou isquemia e/ou hipertrofia e/ou fibrose, etc. presente no miocárdio danificado.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho em camundongos em que a amiodarona se mostrou eficaz em corrigir as alterações no sistema de condução intraventricular com melhora na duração do QRS. Este resultado vai ao encontro do trabalho de Siqueira (2012) que também observou melhora eletrocardiográfica em *hamsters* cardiopatas chagásicos tratados com amiodarona, porém na fase crônica seis meses após a infecção. Curiosamente, em seres humanos, onde o número de casos estudados é enorme, pois a amiodarona é amplamente

empregada como droga anti-arrítmica de primeira escolha em chagásicos (Chiale *et al.*, 1984; Gali *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2016), nada foi encontrado sobre um eventual efeito benéfico da mesma sobre a velocidade de condução elétrica do sistema His-Purkinje-miocárdio, diretamente implicado na geração do complexo QRS.

Em relação ao intervalo QT, que foi prolongado nos animais não tratados, a amiodarona não se mostrou eficiente em reduzi-lo, quando comparado aos chagásicos não tratados. Tal resultado poderia sugerir que amiodarona não estaria atuando de forma benéfica sobre o dano miocárdico associado à doença de Chagas. Entretanto, não podemos aqui deixar de considerar que talvez a melhora deste parâmetro, o intervalo QT prolongado, possa estar sendo mascarada pelo efeito direto da amiodarona sobre os canais de potássio dos cardiomiócitos. Este fármaco, ao bloquear os canais de potássio do tecido cardíaco, provoca *per se* uma elevação do intervalo QT, uma vez que a onda T do eletrocardiograma representa exatamente a repolarização ventricular, a qual é retardada pela amiodarona (Kodama *et al.*, 1999; Singh, 2006).

O processo inflamatório observado em nosso trabalho no vigésimo primeiro dia pós-infecção foi pronunciado, caracterizado pela presença de grande número de células mononucleares no miocárdio, que não diminuiu significativamente com o tratamento com a amiodarona, exceto na região epicárdica. Leite e Niterói (2008) observaram que no oitavo dia pós-inoculo em camundongos infectados com a Cepa Y, o miocárdio apresentou morfologia semelhante à do coração normal apesar de um discreto espaçamento entre as fibras musculares. Já no décimo quinto dia pós-inoculo, as fibras musculares apresentam-se espaçadas pela presença de exsudato e presença de infiltrado leucocitário com muitos leucócitos (Leite e Niterói, 2008). Soares e Santos (1999) comprovaram que durante a fase aguda, há a destruição das fibras cardíacas quando o ninho de parasitos rompe liberando os antígenos que se ligam à superfície celular e tornam-se alvos de uma resposta imune celular e humoral contra *T. cruzi* (Soares e Santos, 1999).

Com a inflamação do tecido cardíaco a condução elétrica é alterada, servindo de substrato para alterações eletrocardiográficas como prolongamento de complexo QRS e do intervalo QT (Souza *et al.*, 2013), dados encontrados no nosso trabalho. Como a amiodarona induziu a uma melhora do padrão eletrocardiográfico no nosso estudo, este fato reforça a hipótese de uma ação benéfica desse fármaco no curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Com os presentes resultados, nós não somos capazes de explicar porque a melhora no processo inflamatório foi restrita ao epicárdio. Apenas a título de especulação, é possível que a amiodarona tenha uma

distribuição tecidual miocárdica desigual, concentrando-se mais nas regiões epicárdicas do que nas meso- e endocárdicas, talvez devido a uma menor perfusão tecidual fisiológica no endocárdio ou a uma maior lipoafinidade das estruturas teciduais epicárdicas, como sugerido de forma genérica por outros autores (Horowitz e Powell, 1986). Estudos adicionais futuros são necessários para esclarecer melhor este ponto.

Além da possível ação tripanocida acima discutida, a melhora em aspectos elétricos e histopatológicos (melhora do infiltrado inflamatório epicárdico) sugere que a amiodarona possui um papel cardioprotetor independente de seus efeitos no parasito. Achados similares de recuperação na contratilidade espontânea em estudo *in vitro* em cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* (Adesse *et al.*, 2011) e cardio-proteção contra insulto isquêmico em ratos que sofreram infarto do miocárdio (Nokin *et al.*, 1987) reforçam esta ideia.

Um dos fatores determinantes no tropismo e na distribuição tecidual do *T. cruzi* está relacionado à sua variabilidade genética. Assim, a determinação de diferentes padrões de “assinatura gênica”, baseado na variabilidade do kDNA pela técnica de LSSP-PCR, pode representar uma importante ferramenta para identificar diferentes populações genéticas do parasito (Pena *et al.*, 1994). Os padrões observados por essa técnica representam a soma das assinaturas do kDNA dos clones de cada parasito, uma vez que, a cepa Y empregada é policlonal. Essa grande variedade tem origem tanto na diversidade clonal, quanto no fato de que cepas infectantes representam provavelmente combinações de diferentes clones (Macedo e Pena, 1998; Andrade *et al.*, 1999). Em função dessas características, foi possível determinar em nosso estudo, utilizando a técnica de LSSP-PCR, diferenças nos padrões de assinatura gênica entre os camundongos infectados que receberam ou não o tratamento.

Para o nosso conhecimento, essa é a primeira vez que um estudo mostra diferenças na assinatura gênica do *T. cruzi* no coração, induzida pelo tratamento *in vivo* com a amiodarona. As razões para estas diferenças nas assinaturas genéticas dos parasitos nos dois grupos de animais infectados não são conhecidas. Porém podemos especular que as diferenças de sensibilidade ao efeito tripanocida da amiodarona, a qual poderia estar eliminando clones sensíveis poderia ser a causa desta variação genética. Os dados apresentados no presente trabalho não permitem confirmar se esta eventual ação tripanocida clone-seletiva da amiodarona poderia estar diretamente implicada na melhora eletrocardiográfica e na discreta melhora histopatológica (melhora da pericardite) observada nos animais tratados.

Além disso, um eventual efeito benéfico da amiodarona diretamente sobre o coração, independente da sua eventual ação tripanocida, não pode ser descartado. De fato, trabalho do nosso grupo tem evidenciado uma ação estimulatória vagal cardíaca da amiodarona (Dias Da Silva, Gnecci-Ruscione, *et al.*, 2002) a qual poderia via reflexo anti-inflamatório colinérgico vagal (Tracey, 2002) levar a uma redução da inflamação cardíaca e a consequente melhora eletrocardiográfica. Em adição, dado o papel do estresse oxidativo na lesão inflamatória em cardiomiócitos, uma eventual ação antioxidante da amiodarona (Ide *et al.*, 1999; Halici *et al.*, 2007), poderia também estar implicada na melhora eletrocardiográfica e histopatológica observada. Mais estudos necessitam ser realizados para melhor esclarecer os efeitos cardíacos benéficos da amiodarona no contexto da infecção pelo *T. cruzi*. Apesar destas inúmeras dúvidas, ainda remanescentes, as ações cardioprotetora e possivelmente tripanocida clone-seletiva observadas em nosso trabalho, reforçam o potencial da amiodarona como candidata para ser usada em estudos futuros que busquem elucidar os achados observados aqui.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O tratamento com a amiodarona *in vivo* em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, não reduziu de forma significativa a parasitemia. Porém promoveu uma melhora no traçado eletrocardiográfico e no processo inflamatório (epicardite) que podem estar associada à sua ação cardioprotetora. Em adição, o tratamento provocou uma diferença na assinatura genética do parasito presente no tecido cardíaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESSE, D.; AZZAM, E. M.; MEIRELLES MDE, N.; URBINA, J. A.; GARZONI, L. R. Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 1, p. 203-10, 2011.
- AGOSTON, M.; CABELLO, R. G.; BLAZOVICS, A.; FEHER, J.; VERECKEI, A. The effect of amiodarone and/or antioxidant treatment on splenocyte blast transformation. **Clin Chim Acta**, v. 303, n. 1-2, p. 87-94, 2001.
- AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R. Chagas disease in the Amazon region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 47-56, 2007.
- ALMEIDA, E. A.; SILVA, E. L.; GUARIENTO, M. E.; SOUZA, M. L.; AOKI, F. H.; PEDRO RDE, J. [Fatal evolution of Chagas'disease/Aids co-infection: diagnostic difficulties between myocarditis reactivation and chronic chagasic cardiomyopathy]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 199-202, 2009.
- ALVARADO-TAPIAS, E.; MIRANDA-PACHECO, R.; RODRIGUEZ-BONFANTE, C.; VELASQUEZ, G.; LOYO, J.; GIL-OVIEDO, M.; MOGOLLON, N.; PEREZ-AGUILAR, M. C.; RECCHIMUZZI, G.; ESPINOSA, R.; CARRASCO, H. J.; CONCEPCION, J. L.; BONFANTE-CABARCAS, R. A. Electrocardiography repolarization abnormalities are characteristic signs of acute chagasic cardiomyopathy. **Invest Clin**, v. 53, n. 4, p. 378-94, 2012.
- ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; NOGUEIRA, N. F.; BOURGUINGNON, S. C.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M. S. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 1, p. 44-52, 2007.
- ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENNA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol Biochem Parasitol**, v. 100, n. 2, p. 163-72, 1999.
- ANNANG, F.; PEREZ-MORENO, G.; GARCIA-HERNANDEZ, R.; CORDON-OBRA, C.; MARTIN, J.; TORMO, J. R.; RODRIGUEZ, L.; DE PEDRO, N.; GOMEZ-PEREZ, V.; VALENTE, M.; REYES, F.; GENILLOU, O.; VICENTE, F.; CASTANYS, S.; RUIZ-PEREZ, L. M.; NAVARRO, M.; GAMARRO, F.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D. High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 82-91, 2015.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 1, p. 133-8, 1998.

BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. **Manual of histological techniques and their diagnostic application**. Churchill Livingstone, 1994.

BARRETO, G.; VAGO, A. R.; GINTHER, C.; SIMPSON, A. J.; PENA, S. D. Mitochondrial D-loop "signatures" produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. **Am J Hum Genet**, v. 58, n. 3, p. 609-16, 1996.

BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. EDART/USP, 1976.

BELLERA, C. L.; BALCAZAR, D. E.; ALBERCA, L.; LABRIOLA, C. A.; TALEVI, A.; CARRILLO, C. Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects. **J Chem Inf Model**, v. 53, n. 9, p. 2402-8, 2013.

BENAIM, B.; GARCIA, C. R. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. **Trop Biomed**, v. 28, n. 3, p. 471-81, 2011.

BENAIM, G.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, V.; MUJICA-GONZALEZ, S.; PLAZA-ROJAS, L.; SILVA, M. L.; PARRA-GIMENEZ, N.; GARCIA-MARCHAN, Y.; PANIZ-MONDOLFI, A.; UZCANGA, G. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3720-5, 2012.

BENAIM, G.; SANDERS, J. M.; GARCIA-MARCHAN, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDERA, A. R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J. M.; LEON-ROSSELL, A.; CONCEPCION, J. L.; SCHIJMAN, A. G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Amiodarone has intrinsic anti-Trypanosoma cruzi activity and acts synergistically with posaconazole. **J Med Chem**, v. 49, n. 3, p. 892-9, 2006.

BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S. Epicardial lesions in Chagas' heart disease reflect an inflammatory process. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 4, p. 496-8, 2007.

BESTETTI, R. B.; DALBO, C. M.; ARRUDA, C. A.; CORREIA FILHO, D.; FREITAS, O. C. Predictors of sudden cardiac death for patients with Chagas' disease: a hospital-derived cohort study. **Cardiology**, v. 87, n. 6, p. 481-7, 1996.

BESTETTI, R. B.; OLIVEIRA, J. S. [The significance of electrocardiographic study in experimental Chagas cardiopathy in rats]. **Arq Bras Cardiol**, v. 51, n. 2, p. 131-4, 1988.

BESTETTI, R. B.; SOARES, E. G.; SALES-NETO, V. N.; DE ARAUJO, R. C.; OLIVEIRA, J. S. The resting electrocardiogram of T. cruzi-infected rats. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 29, n. 4, p. 224-9, 1987.

BOU, D. D.; TEMPONE, A. G.; PINTO, E. G.; LAGO, J. H.; SARTORELLI, P. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 676-81, 2014.

BRANQUINHA, M. H.; OLIVEIRA, S. S.; SANGENITO, L. S.; SODRE, C. L.; KNEIPP, L. F.; D'AVILA-LEVY, C. M.; SANTOS, A. L. Cruzipain: An Update on its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Curr Med Chem**, v. 22, n. 18, p. 2225-35, 2015.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, 1962.

BRENER, Z.; CANCADO, J. R.; GALVAO, L. M.; DA LUZ, Z. M.; FILARDI LDE, S.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, L. M.; CANCADO, C. B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 149-53, 1993.

BUCKNER, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. **Adv Exp Med Biol**, v. 625, p. 61-80, 2008.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infect**, v. 5, n. 5, p. 419-27, 2003.

BUSTAMANTE, J. M.; CRAFT, J. M.; CROWE, B. D.; KETCHIE, S. A.; TARLETON, R. L. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Infect Dis**, v. 209, n. 1, p. 150-62, 2014.

CABEZA MECKERT, P. M.; CHAMBO, J. G.; LAGUENS, R. P. Modification of the pattern of infection and evolution of cardiopathy in experimental Chagas' disease after treatment with immunosuppressive and trypanocidal drugs. **Medicina (B Aires)**, v. 48, n. 1, p. 7-11, 1988.

CANÇADO, J.; MARRA, U. D.; BRENER, Z. Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 6, p. 12-16, 1964.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.

CARMO, A. A.; ROCHA, M. O.; SILVA, J. L.; IANNI, B. M.; FERNANDES, F.; SABINO, E. C.; RIBEIRO, A. L. Amiodarone and *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with Chagas disease. **Int J Cardiol**, v. 189, p. 182-4, 2015.

CARNEIRO, Z. A.; MAIA, P. I.; SESTI-COSTA, R.; LOPES, C. D.; PEREIRA, T. A.; MILANEZI, C. M.; DA SILVA, M. A.; LOPEZ, R. F.; SILVA, J. S.; DEFLOON, V. M. In vitro and in vivo trypanocidal activity of H2bdtc-loaded solid lipid nanoparticles. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2847, 2014.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Curr Top Med Chem**, v. 2, n. 11, p. 1261-71, 2002.

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um tripanosoma (*Trypanosoma cruzi*); nota prévia. **Brazil Med**, v. 23, p. 161, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 219-275, 1911.

CHAGAS, C.; CHAGAS, E. Manual de doenças tropicais e infectuosas. **Volume I. Livraria Editora Freitas Bastos. Rio de Janeiro, 1935.**

CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P. S.; JESUS, P. C.; OLIVEIRA JUNIOR, W. P.; JUNQUEIRA JUNIOR, L. F. [Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of *Trypanosoma cruzi*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 21, n. 3, p. 95-103, 1988.

CHARLIER, R.; BAUDINE, A.; CHAILLET, F. [Research on the benzofuran series. XXXII. Mode of action of amiodarone on the cardiovascular system]. **Arch Int Physiol Biochim**, v. 75, n. 5, p. 787-808, 1967.

CHIALE, P. A.; HALPERN, M. S.; NAU, G. J.; TAMBUSI, A. M.; PRZYBYLSKI, J.; LAZZARI, J. O.; ELIZARI, M. V.; ROSENBAUM, M. B. Efficacy of amiodarone during long-term treatment of malignant ventricular arrhythmias in patients with chronic chagasic myocarditis. **Am Heart J**, v. 107, n. 4, p. 656-65, 1984.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S12-5, 2010.

COURA, J.; COURA, J. R.; COURA, J. R.; COURA, J. R. Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. 1961.

COURA, J. R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Coura, J.R. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, 2009.

DALIRY, A.; PEREIRA, I. R.; PEREIRA-JUNIOR, P. P.; RAMOS, I. P.; VILAR-PEREIRA, G.; SILVARES, R. R.; LANNES-VIEIRA, J.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C. Levels of circulating anti-muscarinic and anti-adrenergic antibodies and their effect on cardiac arrhythmias and dysautonomia in murine models of Chagas disease. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1769-78, 2014.

DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Struct Funct**, v. 14, n. 4, p. 383-92, 1989.

- DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**, v. 53, n. 2, p. 83-98, 1993.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Rev Cytol**, v. 86, p. 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.
- DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 9, p. 822-38, 2008.
- DIAS DA SILVA, V. J.; GNECCHI-RUSCONE, T.; LAVELLI, B.; BELLINA, V.; MANZELLA, D.; PORTA, A.; MALLIANI, A.; MONTANO, N. Opposite effects of iv amiodarone on cardiovascular vagal and sympathetic efferent activities in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 283, n. 2, p. R543-8, 2002.
- DIAS DA SILVA, V. J.; VIANA PUBLIO, C. C.; DE MELO ALVES, R.; FAZAN, R., JR.; RUSCONE, T. G.; PORTA, A.; MALLIANI, A.; SALGADO, H. C.; MONTANO, N. Intravenous amiodarone modifies autonomic balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 95, n. 1-2, p. 88-96, 2002.
- DIAS, J. C. P. [Chagas' disease. Epidemiology and prevention]. **Arq Bras Cardiol**, v. 63, n. 5, p. 451-5, 1994.
- DIAS, J. C. P.; RAMOS JR, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R.; TORRES, R. M.; MELO, J. R. D. C.; ALMEIDA, E. A. D.; OLIVEIRA JR, W. D. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. SPE., p. 7-86, 2016.
- DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAUJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONCA, J.; ARAUJO, R. F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ARAS, R. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008.
- DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE 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. 880-1, 1988.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 251-61, 2005.
- DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E.; MORENO, S. N. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 310 (Pt 3), p. 1005-12, 1995.

DOCAMPO, R.; STOPPANI, A. O. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Arch Biochem Biophys**, v. 197, n. 1, p. 317-21, 1979.

DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 11, p. 3932-9, 2007.

EICKHOFF, C. S.; LAWRENCE, C. T.; SAGARTZ, J. E.; BRYANT, L. A.; LABOVITZ, A. J.; GALA, S. S.; HOFT, D. F. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. **J Parasitol**, v. 96, n. 4, p. 758-64, 2010.

ELIZARI, M. V.; CHIALE, P. A. Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 4, n. 5, p. 596-608, 1993.

FERREIRA, H. D. O.; PRATA, A.; RASSI, A. Administração prolongada de nitrofurazona no tratamento da doença de Chagas aguda. **O Hospital**, v. 63, p. 1391-1396, 1963.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 443-57, 2002.

FORATTINI, O. P. [Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 14, n. 3, p. 265-99, 1980.

FUSTER, V.; RYDEN, L. E.; CANNOM, D. S.; CRIJNS, H. J.; CURTIS, A. B.; ELLENBOGEN, K. A.; HALPERIN, J. L.; LE HEUZEY, J. Y.; KAY, G. N.; LOWE, J. E.; OLSSON, S. B.; PRYSTOWSKY, E. N.; TAMARGO, J. L.; WANN, S.; TASK FORCE ON PRACTICE GUIDELINES, A. C. O. C. A. H. A.; COMMITTEE FOR PRACTICE GUIDELINES, E. S. O. C.; EUROPEAN HEART RHYTHM, A.; HEART RHYTHM, S. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation). **Eur Heart J**, v. 27, n. 16, p. 1979-2030, 2006.

GALI, W. L.; SARABANDA, A. V.; BAGGIO, J. M.; FERREIRA, L. G.; GOMES, G. G.; MARIN-NETO, J. A.; JUNQUEIRA, L. F. Implantable cardioverter-defibrillators for treatment of sustained ventricular arrhythmias in patients with Chagas' heart disease: comparison with a control group treated with amiodarone alone. **Europace**, v. 16, n. 5, p. 674-80, 2014.

GALLERANO, R. H.; MARR, J. J.; SOSA, R. R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 2, p. 159-66, 1990.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **J Insect Physiol**, v. 53, n. 1, p. 11-21, 2007.

- GARRAUD, O.; ANDREU, G.; ELGHOZZI, M. H.; LAPERCHE, S.; LEFRERE, J. J. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in non-endemic countries. **Travel Med Infect Dis**, v. 5, n. 2, p. 110-2, 2007.
- GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.; BAPTISTA, M. M.; DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES MDE, N.; BRITTO, C. C.; DOCAMPO, R.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. **Int J Antimicrob Agents**, v. 23, n. 3, p. 286-90, 2004.
- GOBBI, P.; LO PRESTI, M. S.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; PAGLINI-OLIVA, P. A.; RIVAROLA, H. W. Allopurinol is effective to modify the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Parasitol Res**, v. 101, n. 5, p. 1459-62, 2007.
- GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D.; GALVAO, L. M.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp Parasitol**, v. 88, n. 1, p. 28-33, 1998.
- GONZALES-PERDOMO, M.; DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 9, p. 1707-14, 1990.
- HALICI, Z.; DENGIZ, G. O.; ODABASOGLU, F.; SULEYMAN, H.; CADIRCI, E.; HALICI, M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. **Eur J Pharmacol**, v. 566, n. 1-3, p. 215-21, 2007.
- HEGER, J. J.; PRYSTOWSKY, E. N.; MILES, W. M.; ZIPES, D. P. Clinical use and pharmacology of amiodarone. **Medical Clinics of North America**, v. 68, n. 5, p. 1339-1366, 1984.
- HIGUCHI MDE, L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, v. 60, n. 1, p. 96-107, 2003.
- HOROWITZ, J. D.; POWELL, A. C. Myocardial uptake of drugs and clinical effects. **Clin Pharmacokinet**, v. 11, n. 5, p. 354-71, 1986.
- HOTEZ, P. J.; DUMONTEIL, E.; WOC-COLBURN, L.; SERPA, J. A.; BEZEK, S.; EDWARDS, M. S.; HALLMARK, C. J.; MUSSELWHITE, L. W.; FLINK, B. J.; BOTTAZZI, M. E. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1498, 2012.
- HUPRIKAR, S.; BOSSERMAN, E.; PATEL, G.; MOORE, A.; PINNEY, S.; ANYANWU, A.; NEOFYTOS, D.; KETTERER, D.; STRIKER, R.; SILVEIRA, F.; QVARNSTROM, Y.; STEURER, F.; HERWALDT, B.; MONTGOMERY, S. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. **Am J Transplant**, v. 13, n. 9, p. 2418-25, 2013.

- IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; UTSUMI, H.; TAKESHITA, A. Amiodarone protects cardiac myocytes against oxidative injury by its free radical scavenging action. **Circulation**, v. 100, n. 7, p. 690-2, 1999.
- JIMENEZ, V.; KEMMERLING, U.; PAREDES, R.; MAYA, J. D.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: a new therapeutic target? **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1411-8, 2014.
- KEENAN, M.; CHAPLIN, J. H.; ALEXANDER, P. W.; ABBOTT, M. J.; BEST, W. M.; KHONG, A.; BOTERO, A.; PEREZ, C.; CORNWALL, S.; THOMPSON, R. A.; WHITE, K. L.; SHACKLEFORD, D. M.; KOLTUN, M.; CHIU, F. C.; MORIZZI, J.; RYAN, E.; CAMPBELL, M.; VON GELDERN, T. W.; SCANDALE, I.; CHATELAIN, E.; CHARMAN, S. A. Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. **J Med Chem**, v. 56, n. 24, p. 10158-70, 2013.
- KENNEDY, J. A.; UNGER, S. A.; HOROWITZ, J. D. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 in rat heart and liver by perhexiline and amiodarone. **Biochem Pharmacol**, v. 52, n. 2, p. 273-80, 1996.
- KIM, H. L.; SEO, J. B.; CHUNG, W. Y.; KIM, S. H.; KIM, M. A.; ZO, J. H. The incidence and predictors of overall adverse effects caused by low dose amiodarone in real-world clinical practice. **Korean J Intern Med**, v. 29, n. 5, p. 588-96, 2014.
- KIM, J. H.; RYU, H. W.; SHIM, J. H.; PARK, K. H.; WITHERS, S. G. Development of new and selective *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors from sulfonamide chalcones and their derivatives. **ChemBiochem**, v. 10, n. 15, p. 2475-9, 2009.
- KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND, P. T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4333-4, 2004.
- KODAMA, I.; KAMIYA, K.; TOYAMA, J. Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. **Am J Cardiol**, v. 84, n. 9A, p. 20R-28R, 1999.
- KRAUS, J. M.; VERLINDE, C. L.; KARIMI, M.; LEPESHEVA, G. I.; GELB, M. H.; BUCKNER, F. S. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. **J Med Chem**, v. 52, n. 6, p. 1639-47, 2009.
- KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Therapeutic activity of some sulfonamide compounds on normal and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium berghei*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 10, n. 6, p. 389-93, 1968.
- LEIBY, D. A.; HERRON, R. M., JR.; GARRATTY, G.; HERWALDT, B. L. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in US blood donors with serologic evidence of infection. **J Infect Dis**, v. 198, n. 4, p. 609-13, 2008.

LEITE, C. U. P.; NITERÓI, R. D. Análise histopatológica e estereológica do coração de camundongos na fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. **Acta Scientiae Medica On line Vol**, v. 1, n. 1, p. 10-18, 2008.

LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; FILHO, J. D.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 11, p. 2307-9, 2006.

LENT, A.; WIGODZINSKY, P. Revision of the triatomine (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bull Am Mus of Nat History**, p. 520, 1979.

LIRA, R.; CONTRERAS, L. M.; RITA, R. M.; URBINA, J. A. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 5, p. 537-46, 2001.

LOPES, E. R. Sudden death in patients with Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 321-4, 1999.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; ALMEIDA, H. D. O.; ROCHA, A. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 9, n. 6, p. 269-282, 1975.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; ANDRADE, Z. A.; ALMEIDA, H. O.; ROCHA, A. [Pathological anatomy of hearts from asymptomatic Chagas disease patients dying in a violent manner]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 2, p. 189-97, 1981.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**, v. 14, n. 3, p. 119-24, 1998.

MACHADO, C. R.; CAMARGOS, E. R.; GUERRA, L. B.; MOREIRA, M. C. Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. **Hum Pathol**, v. 31, n. 1, p. 3-10, 2000.

MACHADO, M. P.; ROCHA, A. M.; DE OLIVEIRA, L. F.; DE CUBA, M. B.; DE OLIVEIRA LOSS, I.; CASTELLANO, L. R.; SILVA, M. V.; MACHADO, J. R.; NASCENTES, G. A.; PAIVA, L. H.; SAVINO, W.; JUNIOR, V. R.; BRUM, P. C.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; SILVA, E. L.; MONTANO, N.; RAMIREZ, L. E.; DIAS DA SILVA, V. J. Autonomic nervous system modulation affects the inflammatory immune response in mice with acute Chagas disease. **Exp Physiol**, v. 97, n. 11, p. 1186-202, 2012.

MAGALHÃES, J.; PONTES, A. U.; ANDRADE, S. G. COMPORTAMENTO DAS CEPAS YE PERUANA DO *TRYPANOSOMA CRUZ/NO* CAMUNDONGO, APUS PASSAGEM EM DIFERENTES MEIOS. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 41-50, 1985.

MAGUIRE, J. H.; HOFF, R.; SHERLOCK, I.; GUIMARAES, A. C.; SLEIGH, A. C.; RAMOS, N. B.; MOTT, K. E.; WELLER, T. H. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease:

prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**, v. 75, n. 6, p. 1140-5, 1987.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A., JR.; AVEZUM, A., JR.; MATTOS, A. C.; RASSI, A.; MORILLO, C. A.; SOSA-ESTANI, S.; YUSUF, S.; INVESTIGATORS, B. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 319-24, 2009.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MOLINA, J.; URBINA, J.; GREF, R.; BRENER, Z.; RODRIGUES JUNIOR, J. M. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole DO870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly(lactide) nanospheres. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 1, p. 101-4, 2001.

MONTALVETTI, A.; ROHLOFF, P.; DOCAMPO, R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of Trypanosoma cruzi. **J Biol Chem**, v. 279, n. 37, p. 38673-82, 2004.

MORALES, M. C.; CARDONI, R. L.; RIMOLDI, M. T.; ESTEVA, M.; MILEI, J. Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. **Medicina (B Aires)**, v. 47, n. 5, p. 493-9, 1987.

MOREIRA, A. A.; DE SOUZA, H. B.; AMATO NETO, V.; MATSUBARA, L.; PINTO, P. L.; TOLEZANO, J. E.; NUNES, E. V.; OKUMURA, M. [Evaluation of the therapeutic activity of itraconazole in chronic infections, experimental and human, by Trypanosoma cruzi]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 34, n. 2, p. 177-80, 1992.

MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of Trypanosoma cruzi. **Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 107, n. 3, p. 367-71, 1994.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **J Eukaryot Microbiol**, v. 56, n. 3, p. 208-13, 2009.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 3, p. 465-81, 2015.

MOTRAN, C. C.; CERBAN, F. M.; RIVAROLA, W.; IOSA, D.; VOTTERO DE CIMA, E. Trypanosoma cruzi: immune response and functional heart damage induced in mice by the main linear B-cell epitope of parasite ribosomal P proteins. **Exp Parasitol**, v. 88, n. 3, p. 223-30, 1998.

MURATORE, C. A.; BARANCHUK, A. Current and emerging therapeutic options for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. **Vasc Health Risk Manag**, v. 6, p. 593-601, 2010.

NOGUEIRA, N. F.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; NOHARA, L. L.; ALMEIDA, I. C.; ZINGALES, B.; COLLI, W. Trypanosoma cruzi: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 2, p. 120-8, 2007.

NOKIN, P.; JUNGBLUTH, L.; MOUTON, J. Protective effects of amiodarone pretreatment on mitochondrial function and high energy phosphates in ischaemic rat heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 19, n. 6, p. 603-14, 1987.

NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L.; COUNCIL ON CHAGAS DISEASE OF THE INTERAMERICAN SOCIETY OF, C. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 9, p. 767-76, 2013.

O'DALY, J. A.; CARRASCO, H.; FERNANDEZ, V.; RODRIGUEZ, M. B. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. **Acta Trop**, v. 56, n. 4, p. 265-87, 1994.

OKUDA, K.; ESTEVA, M.; SEGURA, E. L.; BIJOVSY, A. T. The cytostome of Trypanosoma cruzi epimastigotes is associated with the flagellar complex. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 4, p. 223-31, 1999.

OLMO, F.; COSTAS, M.; MARIN, C.; ROSALES, M. J.; MARTIN-ESCOLANO, R.; CUSSO, O.; GUTIERREZ-SANCHEZ, R.; RIBAS, X.; SANCHEZ-MORENO, M. Tetradentate polyamines as efficient metallodrugs for Chagas disease treatment in murine model. **J Chemother**, p. 1-11, 2016.

OLMO, F.; GUARDIA, J. J.; MARIN, C.; MESSOURI, I.; ROSALES, M. J.; URBANOVA, K.; CHAYBOUN, I.; CHAHBOUN, R.; ALVAREZ-MANZANEDA, E. J.; SANCHEZ-MORENO, M. Prospects of an alternative treatment against Trypanosoma cruzi based on abietic acid derivatives show promising results in Balb/c mouse model. **Eur J Med Chem**, v. 89, p. 683-90, 2015.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annu Rev Microbiol**, v. 41, p. 127-51, 1987.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurantoin compounds. **Antibiot Chemother (Northfield)**, v. 7, n. 1, p. 13-23, 1957.

PARADA, H.; CARRASCO, H. A.; ANEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. **Int J Cardiol**, v. 60, n. 1, p. 49-54, 1997.

PARK, H. S.; KIM, Y. N. Adverse effects of long-term amiodarone therapy. **Korean J Intern Med**, v. 29, n. 5, p. 571-3, 2014.

PATEL, C.; YAN, G. X.; KOWEY, P. R. Dronedarone. **Circulation**, v. 120, n. 7, p. 636-44, 2009.

PENA, S. D.; BARRETO, G.; VAGO, A. R.; DE MARCO, L.; REINACH, F. C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 5, p. 1946-9, 1994.

PEREIRA, I. R.; VILAR-PEREIRA, G.; MARQUES, V.; DA SILVA, A. A.; CAETANO, B.; MOREIRA, O. C.; MACHADO, A. V.; BRUNA-ROMERO, O.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. A human type 5 adenovirus-based Trypanosoma cruzi therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 1, p. e1004594, 2015.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTINEZ, A.; RADI, R. Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 7, p. 723-34, 2013.

PIFANO, F. La dinámica epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el Valle de Los Naranjos, Estado Carabobo, Venezuela: I, contribución al estudio de los focos naturales silvestres del Schizotrypanum cruzi Chagas 1909. **Arch Venez Med Trop Parasitol Med**, v. 5, p. 1-29, 1973.

PODRID, P. J.; KOWEY, P. R. **Handbook of cardiac arrhythmia**. Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

PRATA, A. Evolution of the Clinical and Epidemiological Knowledge about Chagas Disease 90 Years After its Discovery **Mem. do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 81-88, 1999.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 152-8, 2009.

RIZZIOLI, E.; INCASA, E.; GAMBERINI, S.; SAVELLI, S.; ZANGIROLAMI, A.; TAMPIERI, M.; MANFREDINI, R. Acute toxic hepatitis after amiodarone intravenous loading. **Am J Emerg Med**, v. 25, n. 9, p. 1082 e1-4, 2007.

- ROHLOFF, P.; MONTALVETTI, A.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 50, p. 52270-81, 2004.
- ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J Infect Dis**, v. 186, n. 6, p. 823-8, 2002.
- ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNANDEZ, P.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PEREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 2, p. 641-52, 2009.
- RUBIO, J.; CALDERON, J. S.; FLORES, A.; CASTROA, C.; CESPEDES, C. L. Trypanocidal activity of oleoresin and terpenoids isolated from *Pinus oocarpa*. **Z Naturforsch C**, v. 60, n. 9-10, p. 711-6, 2005.
- SALTO, M. L.; KUHLENSCHMIDT, T.; KUHLENSCHMIDT, M.; DE LEDERKREMER, R. M.; DOCAMPO, R. Phospholipid and glycolipid composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 158, n. 2, p. 120-30, 2008.
- SANT'ANNA, C.; PARUSSINI, F.; LOURENCO, D.; DE SOUZA, W.; CAZZULO, J. J.; CUNHA-E-SILVA, N. L. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 6, p. 1187-98, 2008.
- SBARAGLINI, M. L.; BELLERA, C. L.; FRACCAROLI, L.; LAROCCA, L.; CARRILLO, C.; TALEVI, A.; ALBA SOTO, C. D. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 1, p. 91-5, 2016.
- SCALISE, M. L.; ARRUA, E. C.; RIAL, M. S.; ESTEVA, M. I.; SALOMON, C. J.; FICHERA, L. E. Promising Efficacy of Benznidazole Nanoparticles in Acute *Trypanosoma cruzi* Murine Model: In-Vitro and In-Vivo Studies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 2, p. 388-93, 2016.
- SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 31, p. 24215-21, 2000.
- SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 117-43, 1995.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, 2012.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JUNIOR, E. R.; ET AL. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351-7, 1991.

- SINGH, B. N. Amiodarone: a multifaceted antiarrhythmic drug. **Curr Cardiol Rep**, v. 8, n. 5, p. 349-55, 2006.
- SINGH, B. N.; VENKATESH, N.; NADEMANEE, K.; JOSEPHSON, M. A.; KANNAN, R. The historical development, cellular electrophysiology and pharmacology of amiodarone. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 31, n. 4, p. 249-80, 1989.
- SIQUEIRA, S. M. **Efeitos da amiodarona sobre a função autonômica cardíaca em hamsters infectados cronicamente com *Trypanosoma cruzi***. 2012. (Msc). Medicina Tropical e Infectologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- SOARES, M. B.; SANTOS, R. R. D. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 257-262, 1999.
- SOUZA, D.; ALMEIDA, A.; COSTA, F.; COSTA, E.; FIGUEIREDO, M.; PÓVOA, R. Electrocardiograms in the acute phase of Chagas disease through oral transmission. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 26, n. 2, p. 127-130, 2013.
- SOUZA, W. Novel Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: MILES, M. (Ed.). **American Trypanosomiasis World Class Parasites**. Boston: Springer, v.7, 2003. p.13-24.
- STIMPert, K. K.; MONTGOMERY, S. P. Physician awareness of Chagas disease, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 5, p. 871-2, 2010.
- STRAUSS, M.; LO PRESTI, M. S.; BAZAN, P. C.; BAEZ, A.; FAURO, R.; ESTEVES, B.; SANCHEZ NEGRETE, O.; CREMONEZZI, D.; PAGLINI-OLIVA, P. A.; RIVAROLA, H. W. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Int**, v. 62, n. 3, p. 293-9, 2013.
- TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, 2006.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-9, 2002.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 287-95, 2002.
- URBINA, J. A.; CONCEPCION, J. L.; MONTALVETTI, A.; RODRIGUEZ, J. B.; DOCAMPO, R. Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 6, p. 2047-50, 2003.
- URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **Int J Antimicrob Agents**, v. 21, n. 1, p. 39-48, 2003.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S., JR.; MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1805-9, 2000.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D.; CORREA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891-2, 1996.

VASSY, R.; STARZEC, A.; YIN, Y.; NICOLAS, P.; PERRET, G. Y. Amiodarone has exclusively non-genomic action on cardiac beta-adrenoceptor regulation. **Eur J Pharmacol**, v. 408, n. 3, p. 227-32, 2000.

VASTESAEGER, M.; GILLOT, P.; RASSON, G. Etude clinique d'une nouvelle medication anti-angoreuse. **Acta Cardiol (Brux)**, v. 22, p. 483-500, 1967.

VILLALTA, F.; DOBISH, M. C.; NDE, P. N.; KLESHCHENKO, Y. Y.; HARGROVE, T. Y.; JOHNSON, C. A.; WATERMAN, M. R.; JOHNSTON, J. N.; LEPESHEVA, G. I. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 208, n. 3, p. 504-11, 2013.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. ORGANIZATION, W. H.: WHO Press 2010.

WHO. Last Update 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B.; CARDOSO, M. A.; OELEMANN, W.; MOREL, C. M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **Am J Trop Med Hyg**, v. 51, n. 6, p. 771-7, 1994.

YUN, O.; LIMA, M. A.; ELLMAN, T.; CHAMBI, W.; CASTILLO, S.; FLEVAUD, L.; RODDY, P.; PARRENO, F.; ALBAJAR VINAS, P.; PALMA, P. P. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Medecins Sans Frontieres. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 7, p. e488, 2009.

ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; MAIA, M. C.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 5, p. 449-56, 2011.