UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos
na infecção por *Trypanosoma cruzi***

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas a Farmácia

Orientada: Gisele Bulhões Portapilla

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque**

Versão corrigida da Tese de Doutorado e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 18/06/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto /USP.

Ribeirão Preto
2019

RESUMO

PORTAPILLA, G. B. **Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos na infecção por *Trypanosoma cruzi*.** 2019. 90f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Estima-se que cerca de sete milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, inclusive residentes de países não endêmicos. O benznidazol é o fármaco de escolha para tratamento da doença, mas ele causa severos efeitos colaterais e apresentam baixa eficácia em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica avançada. Nas últimas décadas, milhares de substâncias têm sido estudadas na prospecção de novas substâncias ativas contra *Trypanosoma cruzi*. Nesse contexto, os corantes fenotiazínicos representam uma classe de substâncias de alto potencial terapêutico, especialmente o fenotiazínico azul de metileno, que tem sido usado no tratamento da malária e estudado contra outros protozoários, como *Leishmania sp* e *Trypanosoma cruzi*. Portanto, o objetivo desse trabalho foi determinar o potencial tripanocida de corantes fenotiazínicos, combinados ou não ao benznidazol, em protocolos para tratamento *in vitro* e *in vivo* de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Os corantes comerciais (azul de metileno (MB), novo azul de metileno (NMB), azul de toluidina (TBO) e 1,9 dimetil azul de metileno (DMMB) e quatro sintéticos não comerciais (DO15, DO16, DO37 e DO43), foram avaliados, combinados ou não ao benznidazol, em protocolos *in vitro*. No estudo *in vitro*, a atividade tóxica das substâncias foi determinada em células de mamíferos e o ensaio tripanocida, avaliado contra as formas amastigotas da cepa Tulahuen. As substâncias MB e DMMB, combinados ou não ao BZ, foram selecionados para o estudo em animais experimentalmente infectados (cepa Y) durante a fase aguda da infecção. O efeito biológico do tratamento foi monitorado pela parasitemia no sangue de camundongos, seguido de quantificação do DNA parasitário no tecido cardíaco pelo método de qPCR e contagem de ninhos de amastigotas em cortes histológicos. Outras ferramentas de estudo incluíram: determinação de parâmetros bioquímicos (ALT e AST) e análise imunomoduladora em timo e baço dos camundongos. NMB e DMMB inibiram as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em concentrações menores que 100nM. Esse efeito foi potencializado e sinérgico quando ambos foram combinados a TBO nos estudos *in vitro*. Em contrapartida, animais experimentalmente infectados demonstraram um aumento da parasitemia após tratamento com MB, BZ+DMMB, MB+DMMB. Na maioria dos métodos avaliados, esses grupos demostram maior carga parasitária quando comparado com o controle infectado, principalmente BZ+DMMB e MB+DMMB. O aumento da carga parasitária pelo tratamento com MB+DMMB parece estar ligado ao maior recrutamento de células específicas do sistema imune para o local de infecção ou bloqueio de funções importantes do sistema imunológico, uma vez que a atrofia do timo, aumento das populações T duplo negativas e T CD8⁺ estão aumentadas nesse grupo. Da mesma maneira células dendríticas e macrófagos que são células especializadas na fagocitose e reconhecimento de antígenos foram significativamente aumentadas após tratamento com MB+DMMB. Embora os resultados desse trabalho sugerem uma baixa atividade dos fenotiazínicos no estudo *in vivo*, o potencial *in vitro* deve despertar estudos futuros sobre o entendimento da falha terapêutica *in vivo*, principalmente porque MB é um medicamento utilizado em seres humanos, apresenta baixo custo e toxicidade. Estudos futuros devem ser encorajados para contribuir no desenvolvimento de terapias alternativas para tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: 1. Fenotiazínicos. 2. Atividade biológica. 3. *Trypanosoma cruzi*

1. INTRODUÇÃO

A mobilidade humana e eventos epidêmicos sempre estiveram atrelados a história da humanidade. Indígenas que sucumbiram a doenças transmitidas por europeus ou epidemias de cólera, lepra e mais recentemente da gripe A (H1N1) remontam a fragilidade populacional diante das políticas públicas de controle de doenças (BARNETT E WALKER, 2008; VIGNIER E BOUCHAUD, 2018). Atualmente, a mobilização populacional cresce fortalecida pelas várias correntes imigratórias no mundo, seja por pessoas que buscam uma nova oportunidade de emprego ou para aqueles que buscam asilo como consequência de crise econômica e/ou guerras nos países de origem (TROST *et al.*, 2018).

A situação de refugiados abre caminhos para uma discussão ainda maior sobre o impacto de doenças alóctones na economia e saúde dos países anfitriões (DEROSE *et al.*, 2007; DEVILLE *et al.*, 2011). Inúmeros países abrem suas fronteiras em meio a uma discussão polêmica do regime assistencial prestados aos refugiados, que muitas vezes vivem marginalizados e sem acesso a serviços básicos de moradias e saúde (CASTELLI E SULIS, 2017; TROST *et al.*, 2018). Um retrato preocupante é construído, principalmente no que tange a Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN).

As DTN são causadas por diferentes patógenos que prosperam principalmente em regiões pobres de países, cujos sistemas de saúde pública são bastante precários e expõem populações de baixa renda ao risco eminente de infecção (MOLYNEUX *et al.*, 2017). Existem desafios específicos em relação a essas doenças, que exige a conscientização dos países anfitriões para o manejo adequado e controle da infecção (ABBAS *et al.*, 2018; TROST *et al.*, 2018). A negligência aumenta os riscos para a saúde de anfitriões e refugiados em termos de susceptibilidade e disseminação dessas doenças infecciosas (ABBAS *et al.*, 2018).

A introdução de patógenos em novas áreas ou exposição de populações a novas zonas de risco devem ser consideradas pelo menos para a metade das DTNs, incluindo a cólera, tripanossomíase humana africana, esquistossomose, leishmaniose e doença de Chagas (WHO, 2019). A doença de Chagas é uma antropozoonose endêmica em vinte e um países do continente americano, que atualmente apresenta epidemiologia global (WHO, 2019). Estima-se que aproximadamente sete milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, porém milhares delas vivem na Europa, Austrália e Estados Unidos (SORIANO-ARANDES *et al.*, 2016). A migração de pessoas que moravam em áreas de risco, mas que desconheciam ser portadores da doença, foi um fator determinante da disseminação

para países não endêmicos (MOLYNEUX *et al.*, 2017). A falha no diagnóstico e o manejo inadequado da doença, além de características próprias do curso da infecção no hospedeiro, refletem a dificuldade do controle epidemiológico além das fronteiras (COURA E VINAS, 2010). Nesse cenário, a prospecção de terapias alternativas para Doença de Chagas ainda é urgentemente necessária, principalmente para a descoberta de substâncias que possam atuar de maneira efetiva no controle e tratamento dessa doença.

1.1 Doenças de Chagas

Em 22 de abril de 1909, Oswaldo Cruz anunciou à Academia Nacional de Medicina, que o médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1878-1934) identificou o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* como o agente etiológico da doença da Doença de Chagas (COURA, 1997). O processo de descoberta teve início dois anos antes, quando Carlos Chagas viajou a cidade de Lassance (MG) para combater casos de malária entre um grupo de trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil (MONCAYO, 2010)

Como médico e pesquisador, ele coletou alguns insetos que proliferavam intensamente nas frestas das paredes de casas de pau-a-pique e ao examiná-los, identificou um protozoário que chamou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz (MONCAYO, 2010). O médico explorou a capacidade de infecção desse parasito em animais de laboratório e domésticos, mas foi apenas no início de abril de 1909, que ele identificou as formas circulantes no sangue de um ser humano, especificamente em uma menina de três anos chamada Berenice (COURA, 1997). Carlos Chagas foi o único pesquisador na história a descrever todos os aspectos da doença, como as formas evolutivas, ciclo biológico, patogenia, manifestações clínicas e epidemiologia (MONCAYO, 2010).

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado (Família: Trypasonomatidae, Ordem: Kinetoplastida), que possui uma mitocôndria única formada, principalmente por uma rede de DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) extranuclear denominado cinetoplasto (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). A localização do cinetoplasto é sempre próxima ao corpo basal do flagelo, que pode assumir diferentes posições em relação ao núcleo, como consequência das transformações evolutivas que deverá sofrer durante o ciclo de infecção (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012).

O ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* é heteroxênico com passagens por um hospedeiro vertebrado mamífero e um invertebrado pertencente a subfamília Triatominae (MARIN-NETO E RASSI, 2009). O parasito apresenta diferentes estágios de desenvolvimento

que incluem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, presentes no tubo digestivo do inseto vetor, além das formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas presentes no hospedeiro vertebrado (RASSI E MARIN-NETO, 2010).

Sucintamente, o inseto hematófago entra em contato com o sangue de mamíferos infectados e obtêm as formas tripomastigotas sanguíneas que migram para o estômago do inseto, transformando-se em epimastigotas (Figura 1) (CLAYTON, 2010).

Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* simplificado

Fonte: (Venâncio Ribeiro-ICICT Fiocruz)

Essas formas reproduzem-se por fissão binária no intestino médio dos insetos e quando a oferta de nutrientes torna-se escassa, os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que migram para a porção final do tubo digestivo no inseto (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012). A infecção de mamíferos ocorre pelo contato com as formas metacíclicas infecciosas eliminadas com as fezes de triatomíneos após o repasto. A

fricção do local pelo hospedeiro vertebrado, contribuem para a entrada do parasito através da solução de continuidade da pele e mucosas (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018).

O tripomastigotas metacíclicos invadem células reticulo-endoteliais do hospedeiro mamífero e tonam-se amastigotas. Essas formas sofrem replicações por fissão binária e ocupam todo o citoplasma celular (RASSI E MARIN-NETO, 2010). Nessa etapa, as formas amastigotas modificam-se em tripomastigotas que rompem a membrana plasmática e se difundem via corrente sanguínea ou linfática para novas células, com maior tropismo por células musculares cardíacas e esqueléticas (TEIXEIRA *et al.*, 2011). O ciclo natural da doença de Chagas torna-se completo quando tripomastigotas sanguíneas são novamente ingeridas por um Triatomíneo (COURA E BORGES-PEREIRA, 2010).

A via vetorial ainda representa o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas (COURA E BORGES-PEREIRA, 2010). Os triatomíneos são naturalmente encontrados em ninhos de aves, tronco de árvores ou tocas de mamíferos, mas muitas espécies podem viver em ambiente peridomiciliares e adaptarem-se a ambientes domiciliares (Perez-Molina e Molina, 2018). Nesse contexto, os marsupiais e roedores têm especial importância epidemiológica, pois apresentam altas taxas de sinantropia para estabelecer uma ligação entre os ciclos silvestre e domiciliar da doença de Chagas (WEALCKX *ET AL.*, 2015; DE FUENTES-VICENTE *et al.*, 2018).

Inicialmente, o *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como “Barbeiro”, foi considerado o principal vetor da doença de Chagas. No entanto, desde 1979 inúmeros esforços entre países do Cone Sul concentraram-se na eliminação deste vetor, o que proporcionou uma redução de aproximadamente 80% da incidência de novas infecções por *Trypanosoma cruzi* em todo o continente (DIAS, 1987). No entanto, outras espécies são capazes de manter o ciclo evolutivo da doença como, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma brasiliensis* (WALECKX *et al.*, 2015). Atenção especial tem sido dada ao inseto adulto *P. geniculatus* que está amplamente distribuído entre países endêmicos e exibe-se como um importante mecanismo subjacente à transmissão da doença de Chagas. Embora essa espécie seja silvestre, ela apresenta alta intrusão doméstica e um forte potencial adaptativo a ambientes domiciliares (LAZZARI *et al.*, 2013; ABAD-FRANCH *et al.*, 2015).

De maneira indireta, os triatomíneos também estão relacionados aos surtos de casos veiculados ao consumo de alimentos ou ingestão de bebidas contaminadas com fezes do triatomíneo infectado (NOBREGA *et al.*, 2009; NOYA *et al.*, 2015). Em 2010, foram notificados casos da doença de Chagas na Venezuela, após o consumo de suco de goiaba contaminado por um grupo de 103 crianças (ALARCON DE NOYA *et al.*, 2010; NOYA *et al.*,

2015). A bacaba e o açaí são outras fontes comuns de contaminação na Região Norte e Nordeste do Brasil, principalmente pelo consumo do alimento *in natura* (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012). Entre 2000 a 2016 foram confirmados mais de dois mil casos de transmissão após consumo de açaí somente no estado do Pará (Brasil) (SANTOS *et al.*, 2018). É importante citar, que outros mecanismos não vetoriais de transmissão incluem a transfusão sanguínea (bancos de sangue sem triagem específica), congênita (principalmente na fase aguda), acidental (acidentes em laboratórios), oral (ingestão de alimentos e bebidas contaminados) e transplantes (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Estima-se que aproximadamente 94% dos imigrantes que vivem com a doença de Chagas em áreas não endêmicas são inconscientes da condição patológica (SCHMUNIS, 2007; BASILE *et al.*, 2011). O desconhecimento e a falha assistencial dos países anfitriões, entre outros fatores, contribuíram para a disseminação da doença, principalmente em bancos de sangue que não possuíam triagem para doenças alóctones (CONNERS *et al.*, 2016). Não é possível fazer a separação de formas tripomastigotas durante a obtenção dos hemocomponentes do sangue e o risco tem sido maior para transfusão de plaquetas, uma vez que a obtenção dessa fração envolve várias etapas de centrifugação (CANCINO-FAURE *et al.*, 2015). Mães infectadas também podem transmitir o parasito para outras gerações durante a gestação ou no processo do parto. A transmissão congênita foi registrada em países não endêmicos como Espanha, Suíça e Suécia. Somente na Espanha foram diagnosticados 32 casos de crianças soropositivas nascidas de mães infectadas que emigraram da Bolívia (CARLIER *et al.*, 2015).

Independentemente da via de transmissão, o curso da infecção no hospedeiro mamífero segue uma fase aguda e crônica (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). A fase aguda ocorre nas primeiras semanas após a inoculação do parasito, que é capaz de infectar qualquer célula nucleada (BONNEY, 2014). Na transmissão vetorial, o hospedeiro pode apresentar uma resposta inflamatória na porta de entrada do parasito, conhecido como chagoma de inoculação ou sinal de Romanã (edema bipalpebral), que são clinicamente perceptíveis pela presença de edema local (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012)

Os tripomastigotas liberados de células infectadas alcançam a corrente sanguínea e linfática para infectar outras células nucleadas em diferentes tecidos do hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 2011). Nesse estágio, a fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia sanguínea e parasitismo tissular difuso, que em pacientes imunocompetentes, regride em um ou dois meses pela ação da resposta imune dirigida ao parasito (BONNEY *et al.*, 2018).

Com a redução das formas tripomastigotas do sangue, inicia-se um período indeterminado da doença, onde a maioria das pessoas permanece sem quaisquer sintomas

clínicos e muitas vezes, desconhecem a presença da infecção chagásica (RASSI JR *et al.*, 2009). Porém, em um período de 10 a 40 anos pós-contágio, parte dos infectados desenvolve uma fase sintomática, representada por patologias no sistema cardiovascular e/ou digestório (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

1.1.1 Resposta imune e patologia da doença de Chagas

Os mecanismos que conferem resistência a infecção chagásica na fase aguda dependem de maneira efetiva da coordenação entre a resposta imune inata e adaptativa (BONNEY *et al.*, 2018). Células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-Presenting Cell*) como macrófagos e células dendríticas (CDs) fornecem a primeira linha de defesa contra a infecção por *Trypanosoma cruzi* (CARDILLO *et al.*, 2015). Receptores na membrana plasmática dessas células, reconhecem padrões moleculares conservados na membrana dos parasitos e induzem o processo de fagocitose ou macropinocitose (ANDRADE *et al.*, 2014). A interação do patógeno e células de defesa, ativam também a liberação de interleucina-12 (IL-12), óxido nítrico (NO) e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor*) pelos macrófagos, que irão recrutar mais células no local de infecção e reduzir os níveis de parasitismo tecidual e sanguíneo (CARDILLO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 2014). A fagocitose é fundamental para o processamento e apresentação de antígeno para linfócitos T *naïves* residentes em órgãos linfoides periféricos (CABRAL-PICCIN *et al.*, 2016).

O timo é um órgão linfoide primário responsável pela seleção e proliferação da população de linfócitos T do organismo (BLACKBURN E MANLEY, 2004). Os progenitores de células T surgem na medula óssea e migram para o timo como células imaturas denominados duplamente negativos (DN) por ainda não expressarem moléculas CD4 ou CD8 (LEE *et al.*, 2010). Neste estágio, ocorre uma expansão clonal dos timócitos e rearranjos gênicos, que selecionam e diferenciam essas células a duplamente positivas (DP) CD4 e CD8. Após esse processo, as células DP passam por uma nova seleção para tornarem-se simples positivo (SP) CD4⁺ e CD8⁺, processo que as torna aptas a deixarem o timo e migrarem para órgãos linfoides secundários (BLACKBURN E MANLEY, 2004; RODEWALD, 2008).

As APCs migram para os órgãos linfoides secundários e desempenhar a função de apresentadoras de antígenos aos linfócitos T (ANDRADE *et al.*, 2014). Linfócitos de perfil T CD4⁺ desempenham papel importante na produção de citocinas, como o IFN- γ , responsável por desencadear vias de sinalização que promovem a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, o que confere resistência aos fagócitos (FRESNO E GIRONES, 2018). Além disso,

linfócitos citotóxicos T CD8⁺ também podem ser ativados por APCs e recrutados no local da infecção (DA COSTA *et al.*, 2014; FRESNO E GIRONES, 2018). Linfócitos T CD8⁺ possuem a capacidade de produção e liberação de interferon- γ (IFN- γ) e IL-1 β , além de grânulos, como perforinas e granzimas, que atuam na destruição de células infectadas pelo patógeno, por apoptose, impedindo a disseminação da infecção (SILVERIO *et al.*, 2012)

O ambiente inflamatório é crucial para a resistência do hospedeiro à infecção, mas também pode levar ao dano tecidual (RASSI JR *et al.*, 2009). Entre outros fatores, o controle do parasitismo tecidual e sanguíneo pela ação da resposta imune irão determinar as manifestações clínicas do hospedeiro na fase aguda e principalmente na fase crônica da infecção (FERNANDES E ANDREWS, 2012; BONNEY *et al.*, 2018). O parasito mostra um tropismo particular para as fibras musculares cardíacas, embora a cardiopatia chagásica na fase aguda ocorre em menos de 1% dos infectados (BONNEY *et al.*, 2018). Em pacientes sintomáticos há evidências de dano, caracterizado por vacuolização, miocitólise e degeneração miofibrilar como consequência do infiltrado inflamatório, composto de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e principalmente linfócitos T CD8⁺ (ANDRADE *et al.*, 2014; BONNEY *et al.*, 2018). No entanto, a medida que a resposta imune adaptativa do hospedeiro progride, o número de células parasitadas e infiltrado inflamatório diminuem drasticamente, com consequente início da fase crônica (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

A maioria das pessoas não apresentam quaisquer sinais ou sintomas clínicos durante a fase crônica. No entanto, aproximadamente 5 a 10% podem apresentar alterações no sistema nervoso entérico conhecidas como, megaesôfago ou megacólon (MATSUDA *et al.*, 2009). Outra parte dos pacientes podem apresentar alterações inflamatórias no tecido cardíaco que alteram a morfologia e funcionalidade desse órgão em aproximadamente 30% dos indivíduos infectados (RASSI Jr *et al.*, 2009; LEWIS E KELLY, 2016)

O controle do parasitismo na fase aguda da infecção, não elimina o parasito que pode sobreviver por muitas décadas no hospedeiro, mas os fatores que desencadeiam as alterações patológicas na fase crônica ainda não são totalmente compreendidos (TEIXEIRA *et al.*, 2011). Dentre outros fatores, acredita-se que o estímulo imunológico gerado pela persistência de *Trypanosoma cruzi* no tecido possa ativar mecanismos autoimunes do hospedeiro que culminam no dano tecidual (CARDILLO *et al.*, 2015; DE BONA *et al.*, 2018).

O comprometimento cardíaco é a forma clínica mais expressiva da doença de Chagas crônica, principalmente por sua alta morbimortalidade (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). Em contraste com a fase aguda, o infiltrado inflamatório na fase crônica é focal e geralmente há predomínio de células T, macrófagos, com alguns eosinófilos no tecido cardíaco desses

pacientes chagásicos crônicos (TEIXEIRA *et al.*, 2011; BONNEY *et al.*, 2018). Características patológicas clássicas da cardiomiopatia chagásica crônica incluem, miocardite de baixo grau acompanhada por miocitólise, hipertrofia das fibras musculares e fibrose intersticial (ROSSI E BESTETTI, 1995; BONNEY *et al.*, 2018). O processo é predominantemente miocárdico, o que resulta em uma miocardite fibrosante evolutiva com comprometimento do processo de formação do estímulo cardíaco (MARIN-NETO *et al.*, 2007; BONNEY E ENGMAN, 2008). Tais danos geram anormalidades como, arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita, de modo que esse último ocorre na maioria dos casos (RASSI JR *et al.*, 2009)

As alterações patológicas características de megaesôfago e megacólon são consequências das alterações no sistema nervoso autônomo que coordenam a motilidade intestinal (NOGUEIRA-PAIVA *et al.*, 2014). As sequenciais lesões inflamatórias mediadas principalmente por linfócitos T levam a destruição de neurônios parassimpáticos e desnervação no plexo mioentérico de Auerbach e Meissner, responsável pela contratilidade intestinal (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; MATSUDA *et al.*, 2009). Essas lesões estão distribuídas aleatoriamente no esôfago, estômago e intestino delgado e grosso, mas a acalasia dos esfíncteres é um achado comum em pacientes chagásicos com quadro de megaesôfago e megacólon (MATSUDA *et al.*, 2009; JABARI *et al.*, 2014).

1.1.2 Quimioterapia

Os fármacos nitroheterocíclicos nifurtimox (NFX) e benznidazol (BZ) são as únicas terapias disponíveis para o tratamento da doença de Chagas (MANARIN *et al.*, 2013). Estudos sugerem que ambas sofrem bioativação hepática, catalisada por nitrorredutases tipo I ou II, para produzir metabolitos ativos (Figura 2) (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; URBINA, 2010; HALL *et al.*, 2011; HALL E WILKINSON, 2012).

Figura 2. Estrutura química do Nifurtimox e Benznidazol

Fonte: Própria (2019)

A redução química no anel nitrofurano da moléculas do NFX pela ação da enzima nitrorredutases tipo II dependentes de NAD(P)H leva à formação de um intermediário nitroânion ($R-NO_2^-$) fortemente reativo com oxigênio (HALL *et al.*, 2011; SALES JUNIOR *et al.*, 2017). Na presença de oxigênio, o intermediário sofre reoxidação com produção concomitante de ânions superóxido (O_2^-) principal responsável pelos danos oxidativos ao parasito (URBINA, 2010). Alternativamente, a redução de BZ por nitrorredutases tipo I dependente de NADPH parece não desencadear a função oxidativa, mas gerar intermediários reativos, como hidroxilamina (NH_2OH) e o dialdeído glioxial, que tem alta afinidade por macromoléculas vitais para *Trypanosoma cruzi* (CHAUHAN *et al.*, 2008; HALL E WILKINSON, 2012).

Os pesquisadores acreditam que esses mecanismos conferem a ação tripanocida do fármaco, mas poderia estar associada aos efeitos adversos durante o tratamento dos pacientes (CASTRO *et al.*, 2006; URBINA, 2010). Os intermediários nitroreduzidos podem causar efeitos tóxicos a células hospedeiras e provocar diversos efeitos colaterais que muitas vezes, culminam na suspensão do tratamento (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; MARIN-NETO *et al.*, 2009; RASSI *et al.*, 2017).

Os efeitos secundários mais frequentes para o uso do benznidazol são as manifestações cutâneas (hipersensibilidade e dermatite com erupções cutâneas), anorexia, perda de peso, vômitos e alterações psíquicas além de edema generalizado, dor muscular e articular (CASTRO E DIAZ DE TORANZO, 1988; URBINA, 2010). Depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose representam as manifestações mais graves (CASTRO E DIAZ DE TORANZO, 1988; URBINA, 2002; CASTRO *et al.*, 2006).

Ao contrário das nitrorredutases do tipo I, as enzimas do tipo II não são específicas do *Trypanosoma cruzi* e o processo de redução hepática do grupo amino do NFX podem levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) tóxicas para as células do hospedeiro (MORILLA E ROMERO, 2015). Anorexia, perda de peso, alterações psíquicas e manifestações digestivas, tais como náuseas ou vômitos são os principais efeitos adversos demonstrados após tratamento com NFX (CASTRO E DIAZ DE TORANZO, 1988; MAYA *et al.*, 2003). Além disso, o uso desse composto é contraindicado para mulheres grávidas ou para pacientes com doenças renais ou hepáticas graves (HALL *et al.*, 2011). Os efeitos adversos do uso NFX comprometem a segurança para uso em pacientes chagásicos, de modo que a venda dele foi proibida na maioria dos países, inclusive no Brasil (MARIN-NETO *et al.*, 2009).

Outra limitação para ambas substâncias reside especialmente na baixa atividade antiparasitária durante a fase crônica, pois é a forma de maior importância epidemiológica pelas

altas taxas de morbimortalidade (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MORILLO *et al.*, 2015; RASSI *et al.*, 2017). Um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, denominado BENEFIT (do inglês, *BENZnidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*), mostrou que tratamento com BZ em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica avançada não reduz as alterações cardiovasculares ou as taxas de mortalidade entre os pacientes (MORILLO *et al.*, 2015; RASSI *et al.*, 2017).

Os mecanismos da falha terapêutica do BZ nessa fase ainda não são totalmente compreendidos, mas dados recentemente publicados sugerem que os parasitos possam viver em um estado dormente por anos no hospedeiro sem reconhecimento da resposta imune (ALVAREZ *et al.*, 2014). De fato, Sánchez-Valdéz e colaboradores mostraram que amastigotas dormentes não proliferativos, podem transformar-se em tripomastigotas e infectar novas células para manter um nível basal de sobrevivência no hospedeiro. Essa condição também explicaria o fracasso de compostos nitroheterocíclicos na fase crônica da infecção, uma vez que os compostos não possuem atividade contra as formas dormentes (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). Diante dos fatos, a pesquisa de novos tratamentos para a doença de Chagas é urgentemente necessária, principalmente na descoberta de terapias alternativas que atuem de maneira efetiva em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica.

1.2 Fenotiazínicos

Os estudos pioneiros dos compostos fenotiazínicos tiveram início na segunda metade do século XIX, quando o químico alemão Heinrich August Bernthsen descreveu a estrutura química do fenotiazínico, azul de metileno (MB, do inglês *methylene blue*), sintetizado pela primeira vez em 1876 (VARGA *et al.*, 2017). Amplamente utilizado como corante pela indústria têxtil naquele século, o MB foi estudado como corante histológico de patógenos durante os estudos de microscopia do físico alemão Paul Ehrlich (SCHIRMER *et al.*, 2011; BUCHWALOW *et al.*, 2015). Curiosamente, Ehrlich notou que protozoários e bactérias eram preferencialmente corados em um esfregaço sanguíneo, o que ele acreditou ser um indicativo do potencial terapêutico desse composto (BUCHWALOW *et al.*, 2015).

Desde então, o corante foi indicado para tratamento da malária durante décadas, principalmente para conter as epidemias entre soldados que lutaram na primeira e na segunda Guerra Mundial (SCHIRMER *et al.*, 2011). No entanto, com o passar dos anos o MB foi substituído por outros antimaláricos mais específicos e ativos, como a cloroquina (BOSCH E ROSICH, 2008).

Os fenotiazínicos representam uma classe de substâncias orgânicas tricíclicas que contêm enxofre e nitrogênio ligados ao carbono 5 e 10 da molécula, respectivamente (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do fenotiazínico

Fonte: Fonte própria (2019)

Pela estrutura bastante simples, os fenotiazínicos permitem uma infinidade de reações químicas para gerar análogos funcionalmente importantes para o tratamento de inúmeras patologias (MOSNAIM *et al.*, 2006). Mais de cinco mil análogos dessa classe de substâncias já foram obtidos. A grande maioria dos fenotiazínicos substituídos na posição do carbono 10 (C-10) exibem potente atividade como antipsicóticos e anti-histamínicos. Embora desenvolvidos há muitos anos, a Clorpromazina e Levomepromazina são fármacos aprovados pelo FDA (do inglês, *Food and drug administration*) e ainda usados como agentes antipsicóticos (PLUTA *et al.*, 2011).

Certamente, o MB tem sido o fenotiazínico mais estudado nos últimos anos, principalmente pelo seu incrível efeito pleiotrópico (SCHIRMER *et al.*, 2011). O pleiotropismo é uma característica de alguns substâncias ou metabolitos deles, de atuarem em diferentes alvos moleculares para exercer uma função biológica (LU *et al.*, 2018). Indicações atuais para MB aprovadas pelo FDA incluem o tratamento da metemoglobinemia hereditária e aguda (PROVAYBLUE™) (CAWEIN *et al.*, 1964), prevenção de infecções do trato urinário em pacientes idosos (UROLENE BLUE™), malária pediátrica (COULIBALY *et al.*, 2009) e na prevenção ou tratamento da neurotoxicidade induzida pelo fármaco Isofosfamida (KUPFER *et al.*, 1994). O MB também tem sido considerado eficaz no priapismo, contra o choque séptico (bloqueando a guanilato-ciclase dependente de NO) e doença de Alzheimer (OZ *et al.*, 2009; ATAMNA E KUMAR, 2010).

Nos últimos anos, os estudos do papel do MB no tratamento da malária foram revisados como uma estratégia terapêutica no combate ao aumento dos casos de resistência do protozoário aos tratamentos padrões (COULIBALY *et al.*, 2009; COULIBALY *et al.*, 2015). Tanto o MB quanto os produtos desmetilados dele, demonstram reatividade e afinidade principalmente nas

vias relacionados ao balanço oxidativo (HOWLAND, 2016). A redução enzimática de MB dependente de NADPH, gera o metabolito sem cor, leucoMB que pode ser reoxidado por oxigênio molecular (O_2) ou por substâncias contendo ferro (III), como metemoglobina. O NADPH e O_2 são consumidos nesse processo e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido em cada ciclo do ciclo (Figura 4) (SCHIRMER *et al.*, 2003; BUCHHOLZ *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2018).

Figura 4. Mecanismo de ação de MB como substrato no ciclo-redox da GR de *P. falciparum*

Fonte. Fonte própria (2019)

A fim de sobreviver no hospedeiro humano e no vetor da malária, *Anopheles*, os parasitos da malária dependem de uma eficiente defesa antioxidante e adequada regulação do ciclo redox (BUCHHOLZ *et al.*, 2008). Dentre outras enzimas, a flavoenzima glutatona redutase (GR) desempenham importante função de detoxificação no *Plasmodium* sp. O MB pode ser um reduzido e/ou substrato do ciclo redox da glutatona reductase do parasito. Independente da via, a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido (O_2^-) ou H_2O_2 , aumentam a cada ciclo de reoxidação de MB e extrapolam a capacidade de detoxificação intracelular. Esses produtos são tóxicos ao protozoário, principalmente para as formas sanguíneas (SCHIRMER *et al.*, 2003; BUCHHOLZ *et al.*, 2008). É importante citar que o MB tem sido estudado em combinação a outros fármacos antimaláricos, como pirimetamina, quinina e artesunato-amadioquina (GARAVITO *et al.*, 2012).

Por um mecanismo bastante semelhante ao descrito acima, MB parece ser ativo contra outros protozoários. Boda e colaboradores, mostraram que o MB apresentou forte atividade contra *Trypanosoma brucei* em protocolos *in vitro*. A ação de MB foi capaz de inibir as formas tripomastigotas em concentrações nanomolares (BODA *et al.*, 2006). Outros trabalhos também

demonstraram os efeitos de MB sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* sp (MAUEL, 1984; GIRONES *et al.*, 2006; KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2007; SBEGHEN *et al.*, 2015).

Os tripanosomatídeos possuem um sistema de detoxificação formados por tióis, especificamente por ação da enzima tripanotiona redutase (TR). Essa flavoenzima dependente de NADPH, catalisa a redução de tripanotiona dissulfeto (TS₂) para tripanotiona ditiol (T(SH)₂) (KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2007; FLOHE, 2012). Os tripanosomatídeos não possuem as enzimas GR ou a tiorredoxina redutase, de modo que a TR é a única conexão entre os sistemas redox baseados em NADPH e tiol (KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2007; BEIG *et al.*, 2015). Com uma homologia em cerca de 40% com a GR, alguns estudos sugerem que a TR também possa ser alvo da ação de MB, que podem inibir a atividade ou ser substrato subversivo da TR (BODA *et al.*, 2006; BUCHHOLZ *et al.*, 2008; BEIG *et al.*, 2015). Quando o sistema MB-enzima-O₂ atuam conjuntamente como redutores, uma espécie reativa de oxigênio, H₂O₂ ou superóxido é produzida em cada ciclo, o que gera alta toxicidade para o parasito (BUCHHOLZ *et al.*, 2008; BEIG *et al.*, 2015).

É importante citar, que uma das formas mais eficazes de causar desequilíbrio redox nas células é o uso da fotoativação. Nesse aspecto, a classe de compostos fenotiazínicos representam outra importante fonte da atividade biológica por atuarem como fotossensibilizadores (FS) importantes na terapia fotodinâmica (TFD) (DAI *et al.*, 2009; WAINWRIGHT *et al.*, 2011). A exposição de um fotossensibilizador à luz de um comprimento de onda específico levará à absorção de luz e à produção de espécies excitadas que em última análise, transferem a energia de excitação para o oxigênio para gerar EROs (GABRIELLI *et al.*, 2004; BAPTISTA E WAINWRIGHT, 2011)

Nesse sentido, os FS têm sido estudado de maneira bastante abrangente contra vírus (LAGO *et al.*, 2018), bactérias (NEMEZIO *et al.*, 2017), fungos (TRZASKA *et al.*, 2017), *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (GIRONES *et al.*, 2006; WAINWRIGHT E BAPTISTA, 2011). Uma vez que o *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida dependente da passagem pelo sangue do hospedeiro, estudos sugerem que MB é eficaz contra as formas tripomastigotas sanguíneas na presença de luz, tanto em protocolos *in vitro* como *in vivo* (GIRONES *et al.*, 2006).

Sbeghen e colaboradores demonstraram que hamsters infectados por *Leishmania braziliensis* apresentaram cicatrização e redução significativa das lesões cutâneas após tratamento com MB durante uma hora sob laser de emissão vermelha (660nm) (SBEGHEN *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que a TFD mediada por 50 µM de MB em promastigotas de

L. amazonensis causou alterações na permeabilidade da membrana celular e despolarização da membrana mitocondrial do parasito. Alterações ultraestruturas vacuolização intensa do citoplasma, aumento de todo o complexo mitocôndria e citoplasma também foram relatados (AURELIANO *et al.*, 2018).

Dada a grande versatilidade e possibilidade de aplicações biológicas para MB e análogos, o papel dos fenotiazínicos na infecção por protozoário é ainda inexplorado. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade e mecanismo de ação do MB e análogos deles na infecção experimental *in vitro* e *in vivo* pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*.

6. CONCLUSÃO

Esse presente trabalho trouxe uma proposta desafiadora e pioneira de avaliar dois corantes fenotiazínicos em protocolos experimentais de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Embora os resultados possam desencorajar a continuidade de pesquisas com MB e DMMB, um longo caminho ainda deve ser percorrido para entender a desconexão entre resultados *in vitro* e *in vivo*. Obviamente a complexidade de um sistema biológico oferece inúmeros obstáculos para o sucesso terapêutico de quaisquer compostos, principalmente para alvos intracelulares. Variações da dosagem, sistemas de proteção em nanopartículas, fotossensibilização dos compostos, assim como avaliação de parâmetros oxidativos e imunológicos aprofundados representam algumas das ferramentas disponíveis para compreender as interações dessas moléculas em sistemas biológicos. A considerar que o MB é um corante de baixo custo, fácil obtenção e utilizado para tratamento de diversas patologias, esse trabalho deve despertar o interesse para um estudo mais aprofundando para propor novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F. et al. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. **Acta Trop**, Jul 2015.
- ABBAS, M. et al. Migrant and refugee populations: a public health and policy perspective on a continuing global crisis. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 7, p. 113, 2018.
- AHN, H. et al. Methylene blue inhibits NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasome activation. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12409, Sep 29 2017.
- ALARCON DE NOYA, B. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **J Infect Dis**, v. 201, n. 9, p. 1308-15, May 1 2010.
- ALVAREZ, J. M. et al. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 912965, 2014.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.
- ATAMNA, H.; KUMAR, R. Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S439-52, 2010.
- AURELIANO, D. P. et al. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 23, p. 1-8, Sep 2018.
- BAHIA, M. T. et al. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4362-4370, 2014.
- BALOUZ, V.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Adv Parasitol**, v. 97, p. 1-45, 2017.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan 2011.
- BARNETT, E. D.; WALKER, P. F. Role of immigrants and migrants in emerging infectious diseases. **Med Clin North Am**, v. 92, n. 6, p. 1447-58, xi-xii, Nov 2008.
- BASILE, L. et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveill**, v. 16, n. 37, Sep 15 2011.
- BEIG, M. et al. Trypanothione reductase: a target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003773-e0003773, 2015.
- BERENBAUM, M. C. A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 122-130, 1978.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, Apr 2016.

BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 278-89, Apr 2004.

BODA, C. et al. Trypanocidal activity of methylene blue. Evidence for in vitro efficacy and in vivo failure. **Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 16-9, 2006.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v. 21, p. 11, 2014.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Current molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 510-518, 2008.

BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annu Rev Pathol**, Oct 24 2018.

BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 6b, p. 1373-84, Jun 2010.

BOSCH, F.; ROSICH, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. **Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171-9, 2008.

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, Nov-Dec 1962.

BRITTO, C. et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, v. 110 (Pt 3), p. 241-7, Apr 1995.

BUCHHOLZ, K. et al. Cytotoxic interactions of methylene blue with trypanosomatid-specific disulfide reductases and their dithiol products. **Mol Biochem Parasitol**, v. 160, n. 1, p. 65-9, Jul 2008.

BUCHWALOW, I.; BOECKER, W.; TIEMANN, M. The contribution of Paul Ehrlich to histochemistry: a tribute on the occasion of the centenary of his death. **Virchows Arch**, v. 466, n. 1, p. 111-6, Jan 2015.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2592-7, Nov 1996.

CABRAL-PICCIN, M. P. et al. Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Death Dis**, v. 7, p. e2232, May 19 2016.

CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **J Immunol**, v. 159, n. 12, p. 6131-9, Dec 15 1997.

CAMPOS, J. D. et al. Use of Noninvasive Parameters to Evaluate Swiss Webster Mice During *Trypanosoma cruzi* Experimental Acute Infection. **J Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 280-5, Apr 2016.

CANCINO-FAURE, B. et al. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1249-55, Jun 2015.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and disease**, v. 73, n. 9, p. ftv082-ftv082, 2015. ISSN 2049-632X.

CARDILLO, F et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, Jan 1996.

CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: an update. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363-368, 2015.

CASTELLI, F.; SULIS, G. Migration and infectious diseases. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 5, p. 283-289, May 2017.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471-9, Aug 2006.

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

CAWEIN, M. et al. HEREDITARY DIAPHORASE DEFICIENCY AND METHEMOGLOBINEMIA. **Arch Intern Med**, v. 113, p. 578-85, Apr 1964.

CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug Design Development and Therapy**, v. 9, p. 4807-4823, 2015.

CHAUHAN, S. C.; PADMANABHAN, P. K.; MADHUBALA, R. Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 11, p. 957-65, Nov 2008.

CHOU, T.-C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984/01/01/ 1984.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-5, Jun 24 2010.

CONNERS, E. E. et al. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta tropica**, v. 156, p. 68-78, 2016.

COULIBALY, B. et al. Efficacy and safety of triple combination therapy with artesunate-amodiaquine-methylene blue for falciparum malaria in children: a randomized controlled trial in Burkina Faso. **J Infect Dis**, v. 211, n. 5, p. 689-97, Mar 1 2015.

COULIBALY, B. et al. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5318, 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 24 2010.

DA COSTA, T. A. et al. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 962047, 2014.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3, p. 170-188, 2009.

DE BONA, E. et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Front Immunol**, v. 9, p. 1842, 2018.

DE FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 3, p. e24-e24, 2006.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. **Acta Trop**, v. 183, p. 23-31, Jul 2018.

DE MEIS, J. et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 574020-574020, 2012.

DEROSE, K. P.; ESCARCE, J. J.; LURIE, N. Immigrants and health care: sources of vulnerability. **Health Aff (Millwood)**, v. 26, n. 5, p. 1258-68, Sep-Oct 2007.

DEVILLE, W. et al. Health care for immigrants in Europe: is there still consensus among country experts about principles of good practice? A Delphi study. **BMC Public Health**, v. 11, p. 699, Sep 13 2011.

DIAS, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitol Today**, v. 3, n. 11, p. 336-41, Nov 1987.

DÍAZ DE TORANZO, E. G. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-1, Oct 1988.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734-747, May 2012.

FLOHE, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 1, p. 294-301, Jan-Feb 2012.

FRANCISCO, A. F. et al. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. **Sci Rep**, v. 6, p. 35351, Oct 17 2016.

FRESNO, M.; GIRONES, N. Regulatory Lymphoid and Myeloid Cells Determine the Cardiac Immunopathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Front Microbiol**, v. 9, p. 351, 2018.

GABRIELLI, D. et al. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochem Photobiol**, v. 79, n. 3, p. 227-32, Mar 2004.

GARAVITO, G. et al. The in vivo antimalarial activity of methylene blue combined with pyrimethamine, chloroquine and quinine. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 820-3, Sep 2012.

GIRONES, N. et al. The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. **Vox Sang**, v. 91, n. 4, p. 285-91, Nov 2006.

GIRONES, N. et al. Global metabolomic profiling of acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3337, Nov 2014.

GONCALVES, V. M. et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **J Biol Chem**, v. 286, n. 15, p. 13088-95, Apr 15 2011.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115-123, Jan 2012.

HOWLAND, R. H. Methylene Blue: The Long and Winding Road From Stain to Brain: Part 2. **J Psychosoc Nurs Ment Health Serv**, v. 54, n. 10, p. 21-26, Oct 1 2016.

JABARI, S. et al. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 235-244, 2014.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **J Clin Immunol**, v. 30, n. 5, p. 628-31, Sep 2010.

KRAUTH-SIEGEL, L. R.; COMINI, M. A.; SCHLECKER, T. The trypanothione system. **Subcell Biochem**, v. 44, p. 231-51, 2007.

KUPFER, A. et al. Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. **Lancet**, v. 343, n. 8900, p. 763-4, Mar 26 1994.

LAGO, A. D. N. et al. Resolution of herpes simplex in the nose wing region using photodynamic therapy and photobiomodulation. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 23, p. 237-239, Sep 2018.

LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8⁺ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 299-304, Apr 2003.

LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 34-47, 2013.

LEE, D. K.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. The thymus and the immune system: layered levels of control. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 10 Suppl 4, p. S273-6, Oct 2010.

LEITE-DE-MORAES, M. C. et al. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 77, n. 1, p. 95-8, Sep 1992.

LEPLETIER, A. et al. *Trypanosoma cruzi* disrupts thymic homeostasis by altering intrathymic and systemic stress-related endocrine circuitries. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2470-e2470, 2013.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 11, p. 899-911, 2016.

LU, G. et al. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 59, 2018/04/25 2018. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1045-3> >.

MANARIN, R. et al. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Int**, v. 62, n. 1, p. 79-81, Feb 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 6 2007.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. **Rev Esp Cardiol**, v. 62, n. 11, p. 1211-6, Nov 2009.

MARIN-NETO, J. A. et al. 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, Jul 2009.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MAUEL, J. Intracellular parasite killing induced by electron carriers. I. Effect of electron carriers on intracellular *Leishmania* spp. in macrophages from different genetic backgrounds. **Mol Biochem Parasitol**, v. 13, n. 1, p. 83-96, Sep 1984.

MAYA, J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 999-1006, Mar 15 2003.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, // 2017.

MONCAYO, A. Carlos Chagas: biographical sketch. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 1-4, Jul-Aug 2010.

MORAK-MLODAWSKA, B.; PLUTA, K.; JELEN, M. Estimation of the lipophilicity of new anticancer and immunosuppressive 1,8-diazaphenothiazine derivatives. **J Chromatogr Sci**, v. 53, n. 4, p. 462-6, Apr 2015.

MOREIRA, O. C. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. **Acta Trop**, v. 125, n. 1, p. 23-31, Jan 2013.

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, Feb 2015.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 373, n. 14, p. 1295-306, Oct 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOSNAIM, A. D. et al. Phenothiazine molecule provides the basic chemical structure for various classes of pharmacotherapeutic agents. **Am J Ther**, v. 13, n. 3, p. 261-73, May-Jun 2006.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012.

NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 12, p. 823-36, Nov 11 2011.

NEMEZIO, M. A. et al. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 20, p. 234-237, Dec 2017.

NOBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 653-5, Apr 2009.

NOGUEIRA-PAIVA, N. C. et al. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 51-60, 2014.

NOYA, B. A. D. et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377-386, 2015.

ONOFRIO, L. I. et al. *Trypanosoma cruzi* infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003464, Feb 2015.

OZ, M.; LORKE, D. E.; PETROIANU, G. A. Methylene blue and Alzheimer's disease. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 8, p. 927-32, Oct 15 2009.

PAROLI, A. F. et al. NLRP3 Inflammasome and Caspase-1/11 Pathway Orchestrate Different Outcomes in the Host Protection Against *Trypanosoma cruzi* Acute Infection. **Front Immunol**, v. 9, p. 913, 2018.

PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E.; PEREZ-SILANES, S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 28, p. 3154-3170, 2016.

PENAS, F. N. et al. Hepatic injury associated with *Trypanosoma cruzi* infection is attenuated by treatment with 15-deoxy-Delta(12,14) prostaglandin J2. **Exp Parasitol**, v. 170, p. 100-108, Nov 2016.

PEREZ, A. R. et al. Role of Hormonal Circuitry Upon T Cell Development in Chagas Disease: Possible Implications on T Cell Dysfunctions. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 334, 2018.

PEREZ, A. R. et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 7, p. 890-900, Oct 2007.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jan 6 2018.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Trop**, v. 103, n. 3, p. 195-200, Sep 2007.

PLANER, J. D. et al. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, Jul 2014.

PLUTA, K.; MORAK-MLODAWSKA, B.; JELEN, M. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 8, p. 3179-89, Aug 2011.

PROVIDELLO, M. V. et al. ROLE OF ASCORBIC ACID AS SUPPORTING IN THE THERAPEUTIC OF CHAGAS DISEASE: BENEFITS IN THE ASSOCIATION WITH LOW DOSE OF BENZNIDAZOLE. **Antimicrob Agents Chemother**, Jul 9 2018.

RASSI, A., JR.; MARIN, J. A. N.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224-235, 2017.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012. ISSN 1557-9824.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 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, Jul 2009.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993.

RODEWALD, H. R. Thymus organogenesis. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 355-88, 2008.

RODRIGUEZ, H. O. et al. *Trypanosoma cruzi* strains cause different myocarditis patterns in infected mice. **Acta Trop**, v. 139, p. 57-66, Nov 2014. ISSN 0001-706x.

ROJAS, J. C.; BRUCHEY, A. K.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. **Prog Neurobiol**, v. 96, n. 1, p. 32-45, Jan 2012.

ROSSI, M. A.; BESTETTI, R. B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. **Cardiology**, v. 86, n. 1, p. 1-7, 1995.

SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SANCHEZ-VALDEZ, F. J. et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **Elife**, v. 7, Mar 26 2018.

SANTOS, V. et al. Acute Chagas disease in the state of Para, Amazon Region: is it increasing? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. e170298, 2018.

SBEGHEN, M. R. et al. Topical and Intradermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light-Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **J Lasers Med Sci**, v. 6, n. 3, p. 106-11, 2015.

SCARIM, C. B. et al. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **Eur J Med Chem**, v. 155, p. 824-838, Jul 15 2018.

SCHERRMANN, J. M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. **Vascul Pharmacol**, v. 38, n. 6, p. 349-54, Jun 2002.

SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e931, Jan 11 2011.

SCHIRMER, R. H. et al. "Lest we forget you--methylene blue...". **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 12, p. 2325.e7-16, Dec 2011.

SCHIRMER, R. H. et al. Methylene blue as an antimalarial agent. **Redox Rep**, v. 8, n. 5, p. 272-5, 2003.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 30 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012.

SILVA, D. R. et al. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 211-6, Mar 2012.

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012.

SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Trop Med Int Health**, v. 21, n. 5, p. 590-6, May 2016.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592-630, Jul 2011.

TROST, M. et al. Immigration: analysis, trends and outlook on the global research activity. **J Glob Health**, v. 8, n. 1, p. 010414, Jun 2018.

TRZASKA, W. J. et al. Species-specific antifungal activity of blue light. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 4605, Jul 4 2017.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 287-95, 2002.

_____. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010 Jul-Aug 2010.

VAN DE WATERBEEMD, H.; SMITH, D. A.; JONES, B. C. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. **J Comput Aided Mol Des**, v. 15, n. 3, p. 273-86, Mar 2001.

VARGA, B. et al. Possible Biological and Clinical Applications of Phenothiazines. **Anticancer Res**, v. 37, n. 11, p. 5983-5993, Nov 2017.

VENNERSTROM, J. L. et al. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 12, p. 2671-7, Dec 1995.

VIGNIER, N.; BOUCHAUD, O. Travel, Migration and Emerging Infectious Diseases. **Ejifcc**, v. 29, n. 3, p. 175-179, Nov 2018.

VOLPE, D. A. Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development. **Expert Opin Drug Discov**, v. 11, n. 1, p. 91-103, 2016.

VUTSKITS, L. et al. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system. **Anesthesiology**, v. 108, n. 4, p. 684-92, Apr 2008.

WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 3, p. 240-248, 2011/09/01/ 2011.

WAINWRIGHT, M.; MEEGAN, K.; LOUGHRAN, C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. **Dyes and Pigments**, v. 91, n. 1, p. 1-5, 2011/10/01/ 2011.

WALECKX, E.; GOURBIÈRE, S.; DUMONTEIL, E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 324-338, 2015.

WEI, B. et al. Development of a PCR Assay to Detect Low Level *Trypanosoma cruzi* in Blood Specimens Collected with PAXgene Blood DNA Tubes for Clinical Trials Treating Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 12, p. e0005146, Dec 2016.

WINCKER, P. et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. **Parasitology**, v. 114 (Pt 4), p. 367-73, Apr 1997.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103-141, 2013/04/01/ 2013.

ZINGALES, B. et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 0, p. 0, Aug 22 2014.

ZOUNGRANA, A. et al. Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1630, Feb 20 2008.