

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BRENO VILAS BOAS RAIMUNDO

**ESTUDO DE MODELOS EXPERIMENTAIS APLICÁVEIS À
SELEÇÃO DE COMBINAÇÕES DE FÁRMACOS EM
AVALIAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

Alfenas/MG

2019

BRENO VILAS BOAS RAIMUNDO

**ESTUDO DE MODELOS EXPERIMENTAIS APLICÁVEIS À
SELEÇÃO DE COMBINAÇÕES DE FÁRMACOS EM
AVALIAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Interação patógeno-hospedeiro

Orientadora: Profa. Lívia de Figueiredo Diniz

Coorientadora: Dra. Ana Lia Mazzeti Silva

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

R153e Raimundo, Breno Vilas Boas.
Estudo de modelos experimentais aplicáveis à seleção de combinações de fármacos em avaliações pré-clínicas da Doença de Chagas / Breno Vilas Boas Raimundo. -- Alfenas/MG, 2019.
82 f. : il. –

Orientadora: Lívia de Figueiredo Diniz.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Antifúngicos. 2. Amiodarona. 3. Trypanosoma cruzi. I. Diniz, Lívia de Figueiredo. II. Título.

CDD 616.9363



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



BRENO VILAS BOAS RAIMUNDO

**“ESTUDO DE MODELOS EXPERIMENTAIS APLICÁVEIS À SELEÇÃO DE
COMBINAÇÕES DE FÁRMACOS EM AVALIAÇÕES PRÉ-CLÍNICAS DA DOENÇA DE
CHAGAS”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 16 de dezembro de 2019.

Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz Castro
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Livia de Figueiredo Diniz Castro

Profa. Dra. Amanda Fortes Francisco
Instituição: London School of Hygiene and
Tropical Medicine

Assinatura: Amanda Fortes Francisco

Prof. Dr. Sérgio Caldas
Instituição: FUNED-MG

Assinatura: Sérgio Caldas

“É uma verdade que ela tenha morrido de doença de Chagas. Mas é uma verdade pequena. É preciso ampliar um pouco mais essa verdade. Cristina morreu porque a indústria farmacêutica não tem interesse em pesquisar tratamento, vacina e cura para as doenças dos pobres”. Há gente que vive morta. E há gente que morre viva. “Cristina Salazar López morreu viva”.

Barbeiros: os vampiros da realidade
Eliane Brum

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio das agências de fomento à pesquisa FAPEMIG e CAPES pelo apoio ao trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Embora muitos avanços tenham sido realizados no âmbito da quimioterapia da doença de Chagas nos últimos anos, ainda não há tratamento com perfil satisfatório de eficácia e segurança para a fase crônica da infecção por *Trypanosoma cruzi*. O reposicionamento e a combinação de medicamentos têm se destacado como estratégias promissoras na busca de novas terapias. No entanto, paralelamente à busca por novas alternativas, é necessário aprimorar os modelos de avaliação pré-clínica existentes. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do ravuconazol em combinação com amiodarona sobre o desenvolvimento da infecção aguda por *T. cruzi* em diferentes modelos experimentais. Inicialmente foram realizados experimentos *in vitro* para determinar a toxicidade da combinação e a natureza da interação entre os fármacos sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*. Posteriormente foram realizados experimentos *in vivo* utilizando diferentes linhagens de camundongos (*Swiss* e *BALB/c*) e cepas do parasito que apresentam graus variáveis de resistência ao tratamento etiológico (Y e Colombiana). Os animais infectados foram tratados a partir do 5º (cepa Y) ou 10º (cepa Colombiana) dia após a infecção durante 5 dias, por via oral, com ravuconazol (0,5mg/Kg) e amiodarona (50mg/Kg) em monoterapia e em combinação. Grupos controle contendo animais não infectados, infectados e não tratados, infectados e tratados com ravuconazol a 10mg/Kg ou benznidazol na dose de 100mg/Kg foram também incluídos. A parasitemia foi quantificada diariamente durante todo o período de realização do experimento. Cinco dias após o término do tratamento os animais foram eutanasiados e o coração coletado para análises histológicas. Os resultados obtidos permitiram confirmar a atividade tripanossomicida dos fármacos e identificar efeito aditivo resultante da combinação entre amiodarona e ravuconazol *in vitro*, na ausência de toxicidade adicional. *In vivo*, a amiodarona não foi eficiente em controlar a infecção pelas diferentes cepas do parasito, já o efeito do ravuconazol sobre a cepa Y foi dependente da dose e da linhagem de camundongo utilizada; enquanto a 10 mg/Kg o azólico suprimiu a parasitemia dos animais infectados pela cepa Y em ambas as linhagens, o efeito da subdose em controlar o parasitismo foi significativamente menor nos *BALB/c*. Por outro lado, a terapia combinada foi efetiva em reduzir a área sob a curva de parasitemia comparativamente às monoterapias, independente da linhagem de camundongo, sugerindo interação positiva entre os fármacos. Curiosamente, o ravuconazol em subdose reduziu drasticamente a parasitemia dos camundongos infectados pela cepa Colombiana enquanto a combinação não induziu benefício adicional. A avaliação histopatológica do tecido muscular cardíaco mostrou que a utilização combinada de ravuconazol e amiodarona, ao contrário das monoterapias nas mesmas doses, amenizou os danos provocados pela infecção, independente da cepa do parasito ou da linhagem do hospedeiro. Os dados obtidos permitem concluir que a estratégia experimental adotada foi eficiente para avaliar a interação entre os fármacos e sugerem que a linhagem *BALB/c* constitui um modelo mais estrigente para estudos pré-clínicos na quimioterapia da doença de Chagas. Ainda, o ravuconazol e amiodarona combinados apresentam efeito superior às monoterapias em reduzir o parasitismo e prevenir as lesões cardíacas decorrentes da infecção.

Palavras-chave: Ravuconazol, Amiodarona, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Although many advances have been made in the field of Chagas disease chemotherapy in recent years, there is still no treatment with a satisfactory efficacy and safety profile for the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Repositioning and drug combination have been highlighted as promising strategies in the search for new therapies. However, in parallel with the search for new alternatives, it is necessary to improve existing preclinical evaluation models. In this sense, the aim of the present study was to evaluate the effects of ravuconazole in combination with amiodarone on the development of acute *T. cruzi* infection in different experimental models. Initially, *in vitro* experiments were performed to determine the toxicity of the combination and the nature of the drugs on the infection of H9c2 cells by Y strain of *T. cruzi*. Subsequently, *in vivo* experiments were performed using different lineages of mice (Swiss and BALB/c) and strains of the parasite that show varying degrees of resistance to etiological treatment (Y and Colombian). The infected animals were treated from the 5th (strain Y) or 10th (Colombian strain) day after infection for 5 days orally with ravuconazole (0.5mg/kg) and amiodarone (50mg/kg) alone and in combination. Uninfected control group, infected and untreated group, infected and treated with ravuconazole at 10mg/kg or benznidazole at the dose of 100mg / kg were also included. The parasitemia was quantified daily during the whole period of the experiment. Five days after the end of treatment the animals were euthanized and the heart collected for histological analysis. The obtained results allowed to confirm the trypanosomicidal activity of the drugs and to identify additive effect resulting from the combination between amiodarone and ravuconazole *in vitro*, in the absence of additional toxicity. *In vivo*, amiodarone was not efficient in controlling infection by different strains of the parasite, whereas the effect of ravuconazole on Y strain was dependent on the dose and mouse strain used; while at 10 mg/kg azole suppressed the parasitemia of Y strain infected animals in both strains, the effect of underdose on parasitism control was significantly lower in BALB/c. On the other hand, combined therapy was effective in reducing the area under the parasitemia curve compared to monotherapies, regardless of mouse strain, suggesting a positive interaction between drugs. Interestingly, ravuconazole underdose drastically reduced parasitemia in mice infected with the Colombian strain while the combination did not induce additional benefit. Histopathological evaluation of cardiac muscle tissue showed that the combined use of ravuconazole and amiodarone, unlike monotherapy at the same doses, mitigated the damage caused by infection, regardless of the parasite strain or host lineage. The data obtained allow to conclude that the experimental strategy adopted was efficient to evaluate the interaction between drugs and suggest that the BALB/c lineage is a more stringent model for preclinical studies in Chagas disease chemotherapy. In addition, ravuconazole and amiodarone combined have a superior effect than monotherapies in reducing parasitism and preventing heart damage due to infection.

Keywords: Ravuconazole, Amiodarone, *Trypanosoma cruzi*.

FIGURAS

- Figura 1 - Desenho experimental do tratamento com ravuconazol e amiodarona na evolução da infecção aguda pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em duas linhagens de camundongos BALB/c e *Swiss*. 37
- Figura 2 - Desenho experimental do tratamento com ravuconazol e amiodarona na evolução da infecção aguda pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em camundongos da linhagem BALB/c. 37
- Figura 3 - Efeito da incubação com ravuconazol e amiodarona na viabilidade de células H9c2. 39
- Figura 4 - Efeito da incubação com ravuconazol + amiodarona na viabilidade de células H9c2. 40
- Figura 5 - Atividade *in vitro* do ravuconazol e amiodarona, sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 41
- Figura 6 - Curvas de dose-resposta representativas da interação *in vitro* entre ravuconazol e amiodarona sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 42
- Figura 7 - Efeito do tratamento com ravuconazol e amiodarona na evolução da infecção aguda pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em diferentes modelos experimentais. 45
- Figura 8 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre a parasitemia de camundongos da linhagem BALB/c e *Swiss* infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 47
- Figura 9 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o ganho de peso de camundongos da linhagem BALB/c e *Swiss* infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 48
- Figura 10 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o peso relativo do baço de camundongos da linhagem BALB/c e *Swiss* infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 50
- Figura 11 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o processo inflamatório cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c e *Swiss* infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 51
- Figura 12 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o tecido cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 53

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o tecido cardíaco de camundongos da linhagem <i>Swiss</i> infectados pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 54 |
| Figura 14 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre a parasitemia de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> . | 56 |
| Figura 15 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o ganho de peso de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 57 |
| Figura 16 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o peso relativo do baço de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 58 |
| Figura 17 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o processo inflamatório cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 59 |
| Figura 18 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o tecido cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 61 |

TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Fármacos e Reagentes | 29 |
| Tabela 2 – Esquemas de tratamento <i>in vivo</i> de camundongos infectados pela cepa Y de <i>T.cruzi</i> | 34 |
| Tabela 3 - Esquemas de tratamento <i>in vivo</i> de camundongos infectados pela cepa Colombiana de <i>T.cruzi</i> | 34 |
| Tabela 4 – Valores da EC-50 e 90 e o índice de FIC (<i>fractional inhibitory concentration</i>) dos fármacos em monoterapia e em combinação sobre as formas amastigotas de <i>T.cruzi</i> | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AUC** - Área sob a curva
- Amio** - Amiodarona
- Bz** - Benznidazol
- CMC** - Carboximetilcelulose
- CYP51** - c14 α -demetilase
- DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DPT** - Dias pós-tratamento
- DTU** - Discrete typing units
- EDTA** - Ácido etilenodietiletanolamínico
- E1224** - pró-droga do ravuconazol
- HE** - Hematoxilina – Eosina
- Mpk** - Miligramas por quilograma
- Nfx** - Nifutimox
- nM** - Nanomolar
- PBS** - Phosphate buffered saline
- Rv** - Ravuconazol
- SFB** - Soro fetal bovino
- WHO** - World Health Organization

Sumário

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 | <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas..... | 17 |
| 2.1.1 | Heterogeneidade de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 2.1.2 | Tratamento etiológico da doença de Chagas | 20 |
| 2.2 | Quimioterapia experimental..... | 21 |
| 2.2.1 | Reposicionamento e combinação de fármacos | 22 |
| 2.3 | Modelos de avaliação..... | 24 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 27 |
| 4 | OBJETIVOS | 28 |
| 4.1 | Objetivo geral:..... | 28 |
| 4.2 | Objetivos específicos:..... | 28 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 5.1 | Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 29 |
| 5.2 | Fármacos e reagentes | 29 |
| 5.3 | Experimentos <i>in vitro</i> | 29 |
| 5.3.1 | Cultivo de células H9c2 | 29 |
| 5.3.2 | Obtenção do parasito | 30 |
| 5.3.3 | Ensaio de citotoxicidade..... | 30 |
| 5.3.4 | Avaliação das monoterapias e das combinações sobre amastigotas intracelulares da cepa Y de <i>T. cruzi in vitro</i> | 31 |
| 5.3.5 | Determinação da EC-50 e 90 dos fármacos para as formas amastigotas | 31 |
| 5.3.6 | Determinação da natureza da interação entre os fármacos | 32 |
| 5.3.7 | Análise estatística dos experimentos <i>in vitro</i> | 32 |
| 5.4 | Experimentos <i>in vivo</i> | 33 |
| 5.4.1 | Animais | 33 |
| 5.4.2 | Infecção experimental de camundongos pela cepa Y e Colombiana de <i>T.cruzi</i> | 33 |
| 5.4.3 | Esquemas de tratamento | 33 |
| 5.4.4 | Avaliação das alterações de peso dos camundongos e peso relativo do baço..... | 35 |
| 5.4.5 | Avaliação da parasitemia..... | 35 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.4.6 | Eutanásia e coleta de material biológico..... | 35 |
| 5.4.7 | Avaliação histopatológica..... | 35 |
| 5.4.8 | Processamento dos tecidos pela técnica de parafina..... | 35 |
| 5.4.9 | Método de coloração Hematoxilina & Eosina (H&E)..... | 36 |
| 5.4.10 | Análise estatística dos experimentos <i>in vivo</i> | 37 |
| 5.4.11 | Desenho experimental <i>in vivo</i> | 37 |
| 6 | RESULTADOS | 38 |
| 6.1 | Estudos <i>in vitro</i> | 38 |
| 6.1.1 | Análise da citotoxicidade dos fármacos em monoterapia e em combinação sobre cardiomiócitos da linhagem H9c2..... | 38 |
| 6.1.2 | Avaliação da atividade anti- <i>T.cruzi</i> do ravuconazol e amiodarona utilizando células H9c2..... | 40 |
| 6.1.3 | Análise da natureza da interação entre ravuconazol e amiodarona utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y..... | 41 |
| 6.2 | Ensaio <i>in vivo</i> | 43 |
| 7 | DISCUSSÃO | 61 |
| 8 | CONCLUSÃO | 71 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |
| | CERTIFICADO | 82 |

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma doença negligenciada que afeta cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente na América Latina (WHO, 2019). O nifurtimox e o benznidazol são os medicamentos de referência no tratamento da parasitose, porém apresentam eficácia limitada e acentuados efeitos colaterais (COURA, 1997; DIAS; LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2016). Adicionalmente, são utilizados em esquemas posológicos longos, o que, juntamente às reações adversas que induzem, diminuem significativamente a adesão ao tratamento. Nesse sentido, alternativas são necessárias para superação das limitações dos tratamentos disponíveis (MÜLLER KRATZ *et al.*, 2018; TORRICO *et al.*, 2018).

Considerando o reposicionamento de fármacos como estratégia de desenvolvimento farmacológico promissora, nos últimos anos, diversos medicamentos desenvolvidos originalmente para o tratamento de outras doenças foram testados em modelos pré-clínicos da infecção por *T. cruzi* (PLANER *et al.*, 2014; MAZZETI *et al.*, 2019; SIMÕES-SILVA *et al.*, 2019). Destes, destacaram-se os antifúngicos azólicos, particularmente os inibidores da CYP51, posaconazol e ravuconazol (URBINA *et al.*, 2003; DINIZ *et al.*, 2010; FÜGI *et al.*, 2014), os quais figuraram como os mais promissores candidatos na terapêutica da doença de Chagas e foram avaliados em estudos clínicos (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). De particular interesse, o ravuconazol é um inibidor da biossíntese de ergosterol que possui ação extremamente potente anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, no entanto, suas propriedades farmacocinéticas foram desfavoráveis em modelos experimentais animais (DINIZ *et al.*, 2010; URBINA *et al.*, 2003), motivando o desenvolvimento do E1224, também chamado fosravuconazol, um pró-fármaco do ravuconazol. Esse pró-fármaco foi avaliado em estudos pré-clínico (DINIZ *et al.*, 2018) e clínico (TORRICO *et al.*, 2018). Os resultados mostraram que apesar de bem tolerado e eficaz em curar o parasitismo murino causado pela cepa Y parcialmente resistente ao benznidazol, o E1224, apesar de suprimir a parasitemia, não é capaz de induzir cura parasitológica de infecções agudas causadas por cepas resistentes ao benznidazol (DINIZ *et al.*, 2018). Da mesma forma, o estudo clínico revelou perfil favorável de segurança além de

supressão transitória do parasitismo, apesar da incapacidade do pró-fármaco em induzir cura na doença crônica (TORRICO *et al.*, 2018). Resultados similares, tanto relacionados aos modelos experimentais quanto à clínica, foram obtidos para outro antifúngico azólico, o posaconazol (DINIZ *et al.*, 2013; MOLINA *et al.*, 2014).

Os dados mencionados acima enfatizaram a relevância de novos estudos que explorem o efeito dos inibidores de CYP51 em combinação com outros fármacos (URBINA *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, incitaram reflexões sobre o estado da arte e limitações que devem ser sanadas para aumentar o valor translacional dos modelos pré-clínicos da doença de Chagas (CHATELAIN; KONAR, 2015; CHATELAIN, 2017; FRANCISCO *et al.*, 2017; DINIZ *et al.*, 2018). Essas reflexões têm levado à exploração de esquemas terapêuticos diferenciados utilizando os medicamentos de referência e inibidores de CYP51 (BUSTAMANTE *et al.*, 2014; MAZZETI *et al.*, 2018; BENDITA; BRIEFING, 2019), bem como uma avaliação mais profunda da biologia do parasito e seu impacto na infecção experimental. No entanto, há uma escassez de trabalhos que abordem estratégias para otimizar o estudo de combinações de fármacos em âmbito pré-clínico.

No presente estudo exploramos o efeito da combinação de ravuconazol e amiodarona *in vitro* e sobre diferentes modelos experimentais agudos da infecção por *T. cruzi*. A amiodarona é o antiarrítmico de referência para o tratamento sintomático dos distúrbios de condução apresentados na fase crônica da doença de Chagas (RASSI *et al.*, 2008). Ainda, apresenta atividade anti-*T. cruzi* e tem sido estudada na infecção pelo parasito em âmbito experimental (BENAIM *et al.*, 2006; VEIGA SANTOS *et al.*, 2012; PLANER *et al.*, 2014; CASTILHO, 2016; MADIGAN *et al.*, 2019) e em âmbito clínico (CARMO *et al.*, 2015; STEIN *et al.*, 2018). De especial interesse são as evidências de interação sinérgica entre a amiodarona e inibidores da biossíntese de ergosterol (BENAIM *et al.*, 2006; PANIZ-MANDOLFI *et al.* 2009; VEIGA -SANTOS *et al.*, 2012).

Considerando o exposto e ainda, a compreensão da necessidade de buscar estratégias de avaliação pré-clínica que aumentem a robustez da pesquisa translacional no campo da quimioterapia da doença de Chagas, exploramos a natureza da interação entre ravuconazol e amiodarona *in vitro* e a influência da linhagem de camundongo e da cepa do parasito nos efeitos dos fármacos em monoterapia e combinação sobre a evolução da infecção aguda por *T. cruzi*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico abordará tópicos específicos da doença de Chagas.

2.1 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

O protozoário *T. cruzi* foi descoberto pelo médico e cientista Carlos Chagas em 1909, o qual caracterizou a biologia e morfologia do agente etiológico responsável pela manifestação da doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

Os mecanismos de infecção por esse parasito podem ser classificados como primários e secundários. Os primários incluem a via vetorial, transfusão de sangue, oral, placentária ou congênita e os secundários podem ocorrer por acidente laboratorial, transplantes de órgãos ou transmissão sexual (COURA, 2007). A transmissão vetorial ainda é considerada o mecanismo de infecção com maior relevância mundial, tendo em vista que em muitas regiões da América Latina as medidas de controle são incipientes (PETERSON *et al.*, 2015). Contudo, as estratégias de combate à doença de Chagas no Brasil alcançaram ótimos resultados no controle da transmissão vetorial e transfusional nas últimas décadas (SILVA, 2006; PETERSON *et al.*, 2015). O principal mecanismo de infecção no Brasil se dá por via oral (COURA; DIAS, 2009; COURA; JUNQUEIRA, 2012).

A transmissão vetorial ocorre por insetos hematófagos (FLORES-FERRER *et al.*, 2018) da família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo os principais gêneros envolvidos *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (SILVA, 2006). A infecção do triatomíneo acontece durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado parasitado. No intestino anterior do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas sofrerão a diferenciação para epimastigota, sendo a próxima etapa o processo de replicação, que acontece no intestino posterior. A metaciclogênese é o processo de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, as formas infectante (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Durante o repasto sanguíneo, os triatomíneos tendem a defecar, depositando suas fezes contaminadas com o parasito. O prurido, estimulado por constituintes da saliva inoculada pela picada do inseto, faz com que o indivíduo mova as formas infectantes para a ferida (ARGOLO *et al.*, 2008). Os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes passarão através

da mucosa e infectarão qualquer tipo celular (BERN, 2015). Diferentes cepas do *T. cruzi* podem ter tropismos para tipos celulares específicos, como células do sistema mononuclear fagocítico, células nervosas ou musculares (ANDRADE, 1997).

O processo de internalização celular pode ocorrer por fagocitose ou endocitose. Após a formação do vacúolo parasitóforo, os tripomastigotas diferenciam em amastigotas e induzem a lise da membrana do vacúolo dando início a fase de replicação livres no citoplasma. Esse processo culminará no rompimento da célula após diferenciação das amastigotas em tripomastigotas sanguíneos; esses poderão infectar outras células e tecidos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Quando presentes na corrente sanguínea, os tripomastigotas conseguem evadir da resposta imune mediada pelo complemento, o que facilita a migração dos parasitos para outras células e órgãos (DIAS *et al.*, 2016).

Quando não tratada, a infecção evolui sendo classificada em fase aguda e crônica. A primeira tem duração média de 2 meses e é geralmente assintomática em zonas endêmicas (DUTRA; GOLLOB, 2008). Podem ser observados sinais de porta de entrada, como o chagoma de inoculação e o edema bipalpebral conhecido por sinal de Romaña (BERN, 2015).

A complexidade da resposta imune do hospedeiro está intimamente ligada tanto ao controle do parasitismo quanto ao desenvolvimento das manifestações clínicas da doença de Chagas (DUTRA; GOLLOB, 2008). O sistema imunológico é importante nas duas fases da doença. Na fase aguda atua no controle do parasitismo, enquanto na fase crônica diferentes tipos de respostas estão intimamente ligadas às futuras manifestações clínicas (BOSCARDIN *et al.*, 2010; BASSO, 2013). As diversas citocinas e quimiocinas exercem papel determinante no desenvolvimento da resposta imune. Quando ocorre uma alta produção de citocinas elas podem ser encontradas livres na corrente sanguínea (CLARK-LEWIS *et al.*, 1995; DINARELLO, 2007), e a susceptibilidade da doença de Chagas pode estar ligada ao tipo de expressão de citocinas na fase aguda da infecção experimental (ROGGERO *et al.*, 2002).

Com o controle do parasitismo pela resposta imune, a fase crônica terá início e a maioria dos indivíduos permanecem assintomáticos (COURA *et al.*, 2002), caracterizando a forma clínica indeterminada (DUTRA; GOLLOB, 2008). A presença do parasito durante a fase crônica é um fator de estimulação de resposta imune, que

na maioria das vezes será a causa do constante processo inflamatório, sendo o responsável pelo aparecimento de lesões (BONNEY *et al.*, 2019). É comum neste período o desenvolvimento de um processo inflamatório de baixo grau que tende a perpetuar durante toda a fase crônica (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017). De 20 a 50% dos pacientes poderão desenvolver alguma alteração patológica (COURA; DE CASTRO, 2002); cerca de 30% poderão ter problemas cardíacos como a cardiomiopatia, enquanto o megaesôfago e megacólon afetam cerca de 10% dos indivíduos parasitados. A forma mais grave é a cardíaca, que pode culminar em fenômenos tromboembólicos, morte súbita ou insuficiência cardíaca congestiva (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

2.1.1 Heterogeneidade de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi apresenta um padrão de evolução com predomínio de propagação clonal e eventos ocasionais de recombinação genética, que originam linhagens híbridas, por propagação clonal (ZINGALES, 2011). Os isolados do parasito possuem uma heterogeneidade relevante quanto à sua morfologia, seu DNA, virulência, patogenicidade, suscetibilidade a drogas, entre outros parâmetros. Estas diferenças estimularam a busca de marcadores moleculares que pudessem correlacionar o genótipo do parasito com as formas clínicas da doença de Chagas.

A existência de diferentes linhagens e a presença de isolados híbridos foi confirmada por vários marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares (ZINGALES *et al.*, 1999). Com o objetivo de padronizar esta nomenclatura, em 2009, a comunidade científica se reuniu e normatizou a nomenclatura (ZINGALES, 2011) e a partir de então foi recomendado que o parasito seja dividido em seis grupos (*T. cruzi* I–VI); cada grupo é denominado DTU (“*discrete typing unit*”), onde DTU é definido com um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998).

No contexto da ampla heterogeneidade do parasito inclui-se o fenótipo de resistência a fármacos. Sabe-se que existem cepas naturalmente sensíveis ou resistentes ao tratamento de referência com benznidazol *in vivo* (FILARDI; BRENER, 1987), no entanto, os motivos para esse comportamento diferencial frente ao

tratamento etiológico não são completamente conhecidos. Dentre outras, evidências relacionadas aos diferentes percentuais de cura induzidos pelo benznidazol e nifurtimox em distintas regiões geográficas sugerem que características genéticas do parasito e do hospedeiro contribuem para a susceptibilidade diferencial aos fármacos; ainda, a resistência pode ser induzida *in vitro* na presença de fármacos, e os clones resistentes exibem acúmulo de mutações e alterações no número de cópias gênicas (CRUZ *et al.*, 2017; PETRAVICIUS *et al.*, 2019). No entanto, outras observações em modelos experimentais sugerem que o perfil de resistência de *T.cruzi* ao tratamento etiológico tem caráter fenotípico; cepas altamente resistentes ao benznidazol *in vivo* são susceptíveis *in vitro* (BUSTAMANTE *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2018). Ainda, o grau de susceptibilidade ao fármaco em modelos animais pode ser influenciado pelo hospedeiro (CALDAS *et al.*, 2008), passagem do parasito em cultura (DOS SANTOS *et al.*, 2008) e esquema terapêutico utilizado, incluindo tempo para início do tratamento e duração da administração dos fármacos (BUSTAMANTE *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2018; MAZZETI *et al.*, 2018). Recentemente foi descrito um possível mecanismo de resistência do parasito; uma população de amastigotas, em baixo percentual, que é resistente ao tratamento. Enquanto a maioria se diferencia em tripomastigotas seguindo o percurso do ciclo biológico, outras permanecem em dormência e após a pressão do tratamento cessar elas voltam a se diferenciar de forma lenta, perpetuando o parasitismo tecidual (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). Esse fenômeno pode ser um indicativo para explicar o sucesso de um fármaco em induzir cura na fase aguda e o fracasso na fase crônica.

2.1.2 Tratamento etiológico da doença de Chagas

Os únicos medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Chagas surgiram no início da década de 1970, sendo os compostos nitroheterocíclicos benznidazol (Bz) (Benznidazol, LAFEPE) e o nifurtimox (Nfx) (Lampit®, Bayer) (URBINA; DOCAMPO, 2003). A maioria dos agentes nitroheterocíclicos atuam como pró-fármacos e devem sofrer ativação por nitrorredução (HALL; BOT; WILKINSON, 2011).

O Bz tem ação por meio de estresse redutivo envolvendo modificação covalente de macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídios (DOCAMPO, 1990).

Os metabólitos do Bz podem afetar o metabolismo do tripanotoma de *T. cruzi* (MAYA *et al.*, 1997). Também auxilia de forma sinérgica no aumento da fagocitose, na indução de morte do tripanosoma pela indução de IFN- γ (MURTA *et al.*, 1999) e tem ação inibitória da NADH-fumarato de *T. cruzi* (TURRENS *et al.*, 1996).

A redução do Nfx acarreta na produção de metabólitos de oxigênio altamente tóxicos através da sua transformação para um radical aniônico nitro seguido de sua auto-oxidação (DOCAMPO, 1990). Devido às suas propriedades de desintoxicação metabólica deficiente para o oxigênio, *T. cruzi* torna-se suscetível a produtos de redução parcial de oxigênio, especificamente o peróxido de hidrogênio; portanto, é mais sensível à oxidação que as células dos cordados (DOCAMPO, 1990).

Em relação à eficácia terapêutica do benznidazol e do nifurtimox, o estágio da doença em que o paciente se encontra é um fator determinante para cura. Quando o tratamento é administrado na fase aguda da infecção, as chances de cura podem chegar a 100% (BERN, 2011). Durante a fase crônica, as taxas de cura chegam a 60% em crianças (DE ANDRADE *et al.*, 1996) e variam entre 15% a 35% para os adultos (VIOTTI *et al.*, 2006; FABBRO *et al.*, 2007; DE LANA *et al.*, 2009). Adicionalmente, o Bz e o Nfx são administrados em esquema posológico longo (60 dias de tratamento) e apresentam um perfil de toxicidade elevado, fazendo com que entre 15 a 30% dos pacientes abandonem o tratamento (BERN, 2011; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012). O Bz, apesar do perfil farmacológico não satisfatório, apresenta menor frequência de efeitos colaterais em relação ao Nfx, sendo o medicamento de referência no tratamento da doença de Chagas no Brasil (DIAS *et al.*, 2016).

2.2 Quimioterapia experimental

Desde a descoberta da doença de Chagas seu tratamento vem sendo discutido, no entanto, o marco da pesquisa científica em quimioterapia foi na década de 70, com a descoberta do benznidazol e do nifurtimox, a partir de estudos em modelos murinos (DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000).

2.2.1 Reposicionamento e combinação de fármacos

O reposicionamento de fármacos é uma alternativa que consiste na utilização de fármacos já comercializados ou em fase avançada de avaliação clínica para o tratamento de outras doenças. Algumas das vantagens são a redução do custo e o aumento na velocidade de validação de um possível novo medicamento (CHENG; KOVÁCS; BARABÁSI, 2019).

Nesse contexto, os antifúngicos azólicos representam uma alternativa terapêutica promissora, possuindo um conjunto de dados já publicados sobre os efeitos do tratamento na doença de Chagas experimental (URBINA *et al.*, 2003; BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014; FRANCISCO *et al.* 2015; KHARE *et al.*, 2015) e em estudos clínicos (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). O ravuconazol é um antifúngico azólico que tem ação extremamente potente anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (URBINA *et al.*, 2003). Possui como mecanismo de ação a inibição da via de biossíntese de esterol, especialmente, a enzima C14- α -demetilase (CYP51), essencial para a produção do ergosterol. Quando a síntese do ergosterol é inibida, o parasito não é capaz de capturar o colesterol disponível, fato que proporcionará um desequilíbrio estrutural, levando o parasito a morte (URBINA *et al.*, 1998; URBINA, 2009). Apesar da potente ação observada no tratamento da infecção experimental por *T. cruzi*, usando o modelo murino, o ravuconazol, mesmo na forma de pró-fármaco, não foi capaz de induzir a cura parasitológica, mas uma importante supressão da parasitemia quando administrado na fase crônica assintomática, com poucos efeitos colaterais. Os autores concluíram que a falha terapêutica observada poderia ser devida às propriedades farmacocinéticas; quando administrado em camundongos o tempo de meia vida do fármaco é de 4h e em cães, de 8,8h (URBINA *et al.*, 2003; DINIZ *et al.*, 2010).

A partir desses resultados, foi elaborado um novo pró-fármaco solúvel do ravuconazol, o derivado E1224, agora denominado fosravuconazol (DINIZ *et al.*, 2018). Estudos pré-clínicos mostraram que apesar da eficácia aumentada sobre a infecção por uma cepa parcialmente resistente, a melhoria da absorção e biodisponibilidade não foi suficiente para induzir cura da infecção murina causada por cepas multidroga-resistentes (DINIZ *et al.*, 2018). Um ensaio clínico corroborou o efeito do E1224 em suprimir o parasitismo durante o tratamento, resultado muito

similar ao observado no estudo com o ravuconazol em modelo canino. No estudo clínico de fase II assinado por Torrico *et al.* 2018, o E1224 foi avaliado no tratamento de pacientes na fase crônica assintomática da doença. Os resultados mostraram que embora o fármaco tenha perfil satisfatório de segurança, os índices de falha terapêutica foram próximos de 90%. A partir desses resultados e considerando ainda que a combinação de fármacos é uma estratégia promissora para o desenvolvimento farmacológico em médio prazo, um novo estudo clínico está em curso, no qual estão sendo avaliados diferentes esquemas terapêuticos de benznidazol, isoladamente e em combinação com o fosravuconazol (BENDITA; BRIEFING, 2019).

O uso de combinações de fármacos tem sido explorado nos últimos anos na tentativa de encontrar alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes para os pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Esta estratégia pode aumentar a taxa de sucesso do reposicionamento de fármacos (SUN; SANDERSON; ZHENG, 2016), podendo possibilitar que haja interação entre os medicamentos e diminuição dos efeitos colaterais, que é um dos responsáveis pelo abandono prematuro do tratamento (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018).

A amiodarona foi desenvolvida originalmente como um fármaco antianginoso na Bélgica em 1962 (SINGH, 1983) e é amplamente utilizada para o tratamento de arritmias cardíacas na atualidade (VASSALLO; TROHMAN, 2007). É um fármaco altamente lipofílico e possui meia vida longa (ZIPES; LIBBY; BRAUNWALD'S, 2005). É o medicamento de referência para o tratamento sintomático dos distúrbios cardíacos de condução elétrica apresentados na fase crônica da doença de Chagas (RASSI *et al.*, 2008). Apesar da sua alta eficácia, a amiodarona está associada a vários efeitos adversos (OYAMA *et al.*, 2005); os mais comuns estão relacionados com a administração de altas doses (GARG *et al.*, 2012) ou utilização prolongada (NACCA *et al.*, 2012). Entre os efeitos colaterais, são relatados disfunção da tireoide, micro depósitos de lipídios na córnea, manifestações neuromusculares, lesão hepática e toxicidade pulmonar (GARG *et al.*, 2012).

A amiodarona possui ação anti-*T. cruzi in vitro* bem estabelecida (BENAIM *et al.*, 2006). O mecanismo de ação contra o parasito parece se dar por meio de alterações na homeostase dos íons cálcio, por indução da liberação de íons de reservas intracelulares, especificamente, a partir de sua única mitocôndria

(COURCHESNE; OZTURK, 2003; BENAİM *et al.*, 2006). Adicionalmente foi demonstrado que a amiodarona tem ação na inibição da via de biossíntese de ergosterol (COURCHESNE, 2002), mecanismo de ação similar ao dos antifúngicos azólicos (GUPTA *et al.*, 2003). Com relação ao efeito *in vivo*, os relatos constantes da literatura mostram resultados distintos. Benaim *et al.* (2006) observaram que a amiodarona induziu redução da carga parasitária de camundongos parasitados, enquanto Castilho *et al.* (2016) não observaram o mesmo efeito. Ainda, há evidências de efeito positivo resultante da combinação de amiodarona e derivados azólicos; BENAİM *et al.* (2006) e Veiga-Santos *et al.* (2012) mostraram o efeito sinérgico com posaconazol em modelo *in vitro* e *in vivo* (BENAİM *et al.*, 2006). Diferentemente, Planer *et al.* (2014) encontraram um efeito aditivo entre a combinação de posaconazol e amiodarona. De forma interessante, Paniz Mondolfi *et al.* (2009) publicaram um relato de caso mostrando cura parasitológica de uma paciente tratada com amiodarona e itraconazol e, recentemente essa mesma associação foi estudada em cães naturalmente infectados por *T. cruzi*, com relatos de sucesso terapêutico (MADIGAN *et al.*, 2019).

No âmbito clínico, Carmo *et al.* (2015) não observaram redução da carga parasitária resultante do tratamento com antiarrítmico de pacientes crônicos com amiodarona. Em uma recente revisão sistemática realizada por Stein *et al.* (2018), foi possível concluir que o fármaco é efetivo na redução de arritmias ventriculares. Dois outros estudos clínicos estão realizados atualmente para avaliar o efeito antiparasitário e/ou o impacto da amiodarona na progressão das lesões cardíacas de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Considerando as evidências até então publicadas na literatura, alguns estudos tem abordado o desenvolvimento de novas moléculas baseadas na estrutura da amiodarona a fim de melhorar o perfil de segurança e atividade antiparasitária (BENAİM; PANIZ MONDOLFI, 2012).

2.3 Modelos de avaliação

In vitro, *T. cruzi* infecta diversos tipos celulares. A incubação dos fármacos com culturas de células de mamíferos infectadas permite estudos quantitativos. Com pequenas quantidades de fármaco, é possível a detecção da atividade sobre formas intra e/ou extracelulares, como a análise do perfil de toxicidade para a célula

hospedeira. Romanha *et al.* (2010) estabeleceram a relevância da utilização de formas intracelulares do parasito para *screening* de fármacos, no entanto, não há ainda definições na literatura sobre o tipo celular mais adequado (FRANCO *et al.*, 2019).

A linhagem de cardiomiócitos H9c2 é uma linhagem subclonal da linha celular clonal original derivada de tecido embrionário de coração de rato BD1X (KIMES; BRANDT, 1976). É muito usada em estudos *in vitro*, porque os parâmetros morfológicos de suas células se assemelham a cardiomiócitos embrionários imaturos (TAN *et al.*, 2010; LOUCH; SHEEHAN; WOLSKA, 2011; WATKINS; BORTHWICK; ARTHUR, 2011). É particularmente utilizada para análises de perfil de cardiotoxicidade de novas drogas (WITEK *et al.*, 2016). Deve-se estar alerta para o fato de que o tratamento direto fármaco/célula infectada não permite extrapolação dos resultados para experimentos *in vivo*, pois a influência do metabolismo e da resposta imune não podem ser previstas (DE CASTRO; SANTA-RITA; EINICKER-LAMAS, 2000). Por outro lado, as avaliações *in vitro* de alto valor preditivo podem contribuir para nortear as avaliações em modelos *in vivo*, reduzindo a experimentação animal.

In vivo, há também uma vasta gama de possibilidades no estabelecimento de um modelo experimental para estudo da infecção por *T. cruzi*, relacionados à escolha da espécie e genética do hospedeiro e cepas do parasito, carga parasitária inoculada, confirmação do estágio da doença, dentre outros (LANA, 2017; SCARIM *et al.*, 2018). Camundongos são altamente utilizados nestes estudos devido à facilidade de criação, manuseio, custos e por serem modelos que reproduzem as fases aguda e crônica da doença, apesar de algumas limitações (LANA, 2017). É desejável que as avaliações pré-clínicas *in vivo* sejam suficientemente robustas para permitir uma extrapolação dos resultados que irão subsidiar futuros testes clínicos envolvendo pacientes portadores da doença de Chagas.

Apesar de a grande limitação da terapêutica da doença de Chagas ser a fase crônica, em geral, as avaliações iniciais são realizadas em modelo murino de fase aguda da infecção, e apenas as moléculas mais promissoras avançam a estudos de fase crônica (SCARIM *et al.*, 2018). No entanto, mesmo os modelos de fase aguda apresentam enorme variabilidade no que diz respeito às linhagens de camundongos, cepas do parasito, tempo de infecção e tratamento, bem como protocolos de

avaliação de eficácia. Chatelain *et al.* (2015) discutem a problemática da ausência de modelo *in vivo* padronizado para doença de Chagas, sendo as abordagens mais voltadas à elucidação do processo patológico do que ao *screening* de novas moléculas ou à verificação de eficácia terapêutica. Por outro lado, o avanço tecnológico tem permitido o estabelecimento de modelos murinos que permitam revisitar a biologia do parasito e sua interação com o hospedeiro, assim como acompanhar, com alta sensibilidade, a progressão da infecção aguda e crônica e acessar a eficácia terapêutica de fármacos (LEWIS *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-VALDÉZ; PADILLA, 2019; TAYLOR *et al.*, 2019).

Embora muitas discussões e avanços têm sido feitos acerca dos modelos de avaliação pré-clínica da doença de Chagas, tanto no sentido de compreender o processo patológico e sua relação com a heterogeneidade do parasito e do hospedeiro; quanto em acessar com maior sensibilidade o efeito de moléculas com atividade tripanossomicida, pouco tem sido explorado no âmbito de identificar modelos experimentais úteis à identificação de combinações de fármacos promissoras que possam evoluir na escala de avaliação pré-clínica e clínica. Considerando que a terapia de combinação de fármacos é uma alternativa promissora, é de grande relevância a identificação de estratégias que otimizem essa avaliação *in vitro* e *in vivo*.

3 JUSTIFICATIVA

A descoberta de novas moléculas, mais eficazes e seguras, é uma das alternativas para superar as limitações do tratamento disponível para a doença de Chagas. Não obstante, o tempo necessário para a realização de pesquisas de caracterização molecular e avaliação pré-clínica torna-se um fator limitante, especialmente considerando o caráter de negligenciamento dessa parasitose. Nesse sentido, o reposicionamento e a combinação de fármacos têm figurado como estratégias promissoras; enquanto o conhecimento do perfil farmacológico dos medicamentos torna mais ágil o decorrer da pesquisa científica, reduzindo prazos e custos, a combinação de fármacos pode levar ao aumento da eficácia e/ou redução das doses em caso de interação positiva. O número de estudos que abordam essas estratégias tem crescido substancialmente na última década; no entanto, os resultados dos estudos clínicos realizados recentemente indicaram a necessidade de utilização de modelos experimentais mais robustos para estudo destas estratégias, com o objetivo de aumentar o valor translacional das avaliações pré-clínicas. Nesse sentido, há uma necessidade real de explorar mais profundamente os modelos experimentais que servem de base para essas avaliações, bem como aumentar a estringência dos protocolos de estudo.

No presente trabalho são avaliados os efeitos de combinações de fármacos no desenvolvimento da infecção aguda por *T.cruzi* utilizando modelos experimentais distintos que representam a heterogeneidade genética e biológica do parasito e do hospedeiro, fatores diretamente relacionados à resposta ao tratamento etiológico. Por meio de protocolos de tratamento curto, utilizando fármacos que apresentam atividade já bem descrita na literatura – ravuconazol e amiodarona, ambos reposicionados, espera-se determinar, com alta estringência, se há interação entre substâncias *in vivo*, sua relação com os dados obtidos *in vitro* e ainda a influência dos tratamentos na resposta do hospedeiro à infecção. Esses dados contribuirão para o estabelecimento de estratégias de *screening* de combinações de fármacos no âmbito da quimioterapia experimental da doença de Chagas.

4 OBJETIVOS

Segue abaixo os objetivos do trabalho.

4.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos do ravuconazol em combinação com amiodarona sobre diferentes modelos experimentais da infecção por *Trypanosoma cruzi*.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o perfil de citotoxicidade *in vitro* do ravuconazol e amiodarona em monoterapia e em combinação sobre cardiomiócitos da linhagem H9c2;
- Classificar a natureza da interação entre os fármacos *in vitro* sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y;
- Investigar a influência da linhagem do camundongo na resposta ao tratamento com ravuconazol e amiodarona isoladamente e combinados sobre a infecção aguda pelas cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*;
- Identificar o impacto da cepa do parasito sobre o perfil de interação entre os fármacos *in vivo*;
- Avaliar a influência da terapia combinada no desenvolvimento da resposta inflamatória na fase aguda da infecção pelas cepas Y e Colombiana.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Segue abaixo a metodologia do trabalho.

5.1 Cepa de *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas as cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*. A cepa Y foi descrita em 1953 por Silva & Nussenzweig, sendo considerada parcialmente sensível ao benznidazol e ao nifurtimox (FILARDI; BRENER, 1987). A cepa Colombiana foi descrita em 1964 por Federici e é considerada resistente ao benznidazol e nifurtimox (FILARDI; BRENER, 1987). Ambas as cepas são mantidas em laboratório por meio de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos e criopreservação.

5.2 Fármacos e reagentes

Tabela 1 - Fármacos e Reagentes

| | |
|----------------------|---|
| Amiodarona (Amio) | ((2-butyl-1-benzofuran-3-yl)-[4-[2 (diethylamino) ethoxy]-3,5 diiodophenyl] methanone;hydrochloride)) |
| Benznidazol (Bz) | 2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitro-1imidazoleacetamide), Lafepe, usado como fármaco de referência |
| Ravuconazol (Rav) | ([R-(R*,R*)]-4-[2-[2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-metlyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-thiazolyl]benzonitrile) |
| Resazurina | Sal dissódico (Sigma), utilizada como indicador da proliferação celular. |

Fonte: autor

5.3 Experimentos *in vitro*

Metodologia dos experimentos *in vitro*.

5.3.1 Cultivo de células H9c2

Cardiomioblastos da linhagem H9c2 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL 1446) foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina 2 mM e penicilina-estreptomicina, a 37°C, 5% CO₂, como descrito (MORAES; DINIZ; BAHIA, 2015).

5.3.2 Obtenção do parasito

As formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células H9c2 que foram previamente infectadas por tripomastigotas sanguíneos obtidos de camundongos no pico de parasitemia. Após 24 horas da incubação das células com as formas tripomastigotas, o meio de cultura foi removido e os parasitos não internalizados retirados por meio de lavagens sucessivas com PBS. As células foram novamente incubadas a 37°C por 72 horas, quando o sobrenadante, rico em tripomastigotas foi coletado e lavado em meio de cultura. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e ressuspensos em meio de cultura fresco para utilização (DINIZ *et al.*, 2018).

5.3.3 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar os efeitos tóxicos da monoterapia ou da combinação sobre as células hospedeiras, foram utilizadas culturas de células H9c2 não infectadas, incubadas com concentrações decrescentes dos fármacos (5 diluições 1:2 a partir de 200µM para amiodarona e 100nM para o ravuconazol) por 48 horas e posteriormente a viabilidade celular foi quantificada. Duzentos microlitros de suspensão das células H9c2, na concentração de 1x10⁴ células/mL, foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°C, 5% CO₂, por 24 horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio contendo ou não os fármacos isoladamente ou em combinação. Após 48 horas a 37°C, o sobrenadante foi removido e então adicionados, em cada poço, 200 µL de meio de cultura fresco contendo 20 µL de resazurina 1mM, um indicador de proliferação celular (DINIZ *et al.*, 2013). Decorridas 6 horas de incubação, a 37°C, a placa foi lida em leitor de microplacas (570 nm e 600 nm). No ensaio foram incluídos controles negativos (meio+resazurina); positivos (meio+células); controles para avaliar o potencial de

redução do corante fármacos (meio+fármacos) e ainda controle de morte celular (DMSO). O percentual de inibição da proliferação celular induzida pelos fármacos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100$$

Nesta fórmula, A570= Absorbância a 570nm, A600= Absorbância a 600 nm, Controle + é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência do fármaco. R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células [R0 = (A570 / A600)C-]. A absorbância do meio de cultura foi subtraída de todas as amostras (meio na ausência de resazurina) (MAZZETI *et al.*, 2019).

Todas as avaliações *in vitro* foram realizadas no mínimo duas vezes e utilizando três replicatas.

5.3.4 Avaliação das monoterapias e das combinações sobre amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi* *in vitro*

Para avaliar o efeito das combinações sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi* foram utilizados os parâmetros descritos posteriormente.

5.3.5 Determinação da EC-50 e 90 dos fármacos para as formas amastigotas

Células H9c2, mantidas como descrito no item 5.3.1, foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas 1×10^4 células/1mL, sobre lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂, as células foram infectadas, na proporção de 10 parasitos:célula, com formas tripomastigotas da cepa Y, obtidas conforme descrito no item 5.3.2. Decorridas 24 horas, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com meio fresco para remover os parasitos não internalizados. A seguir foi adicionado meio de cultura contendo concentrações crescentes dos fármacos, em diluições seriadas 1:2, sendo as concentrações iniciais

de 20 μM (amiodarona) e 10 nM (ravuconazol). Foram incluídos controles positivos (células infectadas, na ausência de fármacos) e negativos (células e meio). As placas foram novamente incubadas por 48 horas, após o período de incubação as lamínulas foram removidas, lavadas em PBS, fixadas por 5 minutos em metanol e finalmente coradas pelo Giemsa (10% v/v em água destilada). A determinação do número de células infectadas (contendo amastigotas viáveis) foi feita por meio de leitura em microscópio óptico. A partir dos valores de percentual de infecção nas células submetidas ou não à incubação com as drogas foram calculados os valores de EC-50 e EC-90 para os fármacos. Para esse cálculo foi utilizado o programa *CompuSyn*.

5.3.6 Determinação da natureza da interação entre os fármacos

Para investigar a ocorrência do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico resultante da combinação dos fármacos sobre as formas amastigotas, após a identificação dos valores de EC-50 e EC-90 dos fármacos em monoterapia, o valor de EC-50 foi utilizado como concentração inicial para avaliação combinada (6nM ravuconazol e 20 μM amiodarona). Foram realizadas 5 diluições 1:2 dos fármacos combinados (MAZZETI *et al.*, 2019).

A avaliação do efeito anti-*T. cruzi* da combinação sobre amastigotas, foi realizada como descrito no item 5.3.5. Os resultados foram realizados com auxílio do programa *CompuSyn*, o qual calcula, a partir dos valores de EC-50 e EC-90 dos fármacos em cada mistura e nas combinações, os valores de índice de combinação. As curvas de dose-resposta foram construídas no *Graphpad Prism 8.0*.

5.3.7 Análise estatística dos experimentos *in vitro*

Para classificar a natureza da interação entre os fármacos *in vitro*, foi utilizado o valor do índice de combinação (CI- *Combination Index*), calculado no programa *Compusyn*. Se o valor encontrado foi $\leq 0,5$ indica sinergismo; $0,5 < \text{CI} \leq 4$, aditividade e se >4 indica antagonismo (ODDS, 2003).

5.4 Experimentos *in vivo*

Metodologia dos experimentos *in vivo*.

5.4.1 Animais

Foram utilizados 75 camundongos da linhagem BALB/c (isogênicos) e 45 camundongos da linhagem *Swiss* (heterogênicos), fêmeas, com idade entre 28 a 30 dias, pesando entre 18 e 24 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e aclimatados por 7 dias no biotério de experimentação da UNIFAL-MG previamente ao experimento. Foram mantidos com água fresca e ração comercial *ad libitum*. Todos os experimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa do COBEA (Colégio Brasileiro de experimentação) e após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG (Protocolo 04/2019).

5.4.2 Infecção experimental de camundongos pela cepa Y e Colombiana de *T.cruzi*

Quarenta e dois camundongos BALB/c e quarenta e dois camundongos da linhagem *Swiss* foram infectados, por via intraperitoneal, com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T.cruzi*, e 28 camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T.cruzi* obtidas por punção do plexo venoso retro-orbital de camundongos infectados, no dia do pico de parasitemia.

5.4.3 Esquemas de tratamento

Os fármacos foram administrados por via oral, em suspensão de CMC 0,5%, por meio de gavagem. Quando utilizados em combinação, a administração de cada composto foi realizada separadamente, com cerca de 30 minutos de intervalo. O volume total de suspensão administrada foi de 0,2 mL no primeiro dia e ajustado de

acordo com o peso individual até o fim do tratamento. Foram incluídos os grupos-controle: animais infectados e não tratados; e animais não infectados e não tratados.

Tabela 2 – Esquemas de tratamento *in vivo* de camundongos infectados pela cepa Y de *T.cruzi*

| Cepa Y de <i>T.cruzi</i> | |
|---|--------------|
| BALB/c | Swiss |
| amiodarona 50 mpk (n=7) | |
| ravuconazol 0,50 mpk (n=7) | |
| ravuconazol 10 mpk (n=7) | |
| benznidazol 100 mpk (n=7) | |
| ravuconazol 0,50 mpk + amiodarona 50 mpk (n=7) | |
| Controle infectado e não tratado (n=7) | |
| Controle não infectado e não tratado (n=3) | |

Fonte: autor

Tabela 3 - Esquemas de tratamento *in vivo* de camundongos infectados pela cepa Colombiana de *T.cruzi*

| Cepa Colombiana de <i>T.cruzi</i> | |
|---|--|
| BALB/c | |
| amiodarona 50 mpk (n=7) | |
| ravuconazol 0,50 mpk (n=7) | |
| ravuconazol 0,50 mpk + amiodarona 50 mpk (n=7) | |
| Controle infectado e não tratado (n=7) | |
| Controle não infectado e não tratado (n=3) | |

Fonte: autor

5.4.4 Avaliação das alterações de peso dos camundongos e peso relativo do baço

A avaliação de peso foi realizada a cada 5 dias. Primeiramente foi determinado o peso relativo do baço a partir do resultado houve a elaboração do gráfico utilizando o coeficiente do controle não infectado em relação aos grupos infectados.

5.4.5 Avaliação da parasitemia

O exame de sangue a fresco foi realizado diariamente desde a detecção da parasitemia e até um dia antes da necropsia, a fim de determinar a supressão e/ou a manutenção da parasitemia. Cinco microlitros de sangue foram coletados da veia caudal dos camundongos, sendo a quantificação dos parasitos realizada em cinquenta campos em microscópio óptico, segundo a técnica descrita por Brener (1962).

5.4.6 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados e, em seguida, foi procedida a coleta dos seguintes órgãos: coração, fígado, baço, intestino delgado, intestino grosso e músculo esquelético. Fragmentos dos tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C .

5.4.7 Avaliação histopatológica

Para a avaliação histopatológica os órgãos foram fixados em formol tamponado. Passado 24 horas foi realizada a substituição do formol por etanol 70%.

5.4.8 Processamento dos tecidos pela técnica de parafina

Os órgãos que estavam conservados em álcool 70° passaram pelo processo de desidratação, no qual foi utilizada uma bateria de alcoóis em concentrações

crescentes, sendo elas 80°, 90°, 95°, álcool absoluto I, II e III, assim como, álcool absoluto com xilol. Os álcoois foram trocados de uma em uma hora. No processo seguinte, diafanização, os órgãos foram colocados no xilol I, por 30 minutos, e no xilol II, por uma hora. Posteriormente foram levados para o banho de parafina I e foram deixados overnight. No dia seguinte ocorreu o banho de parafina II, por uma hora, seguido pelo processo de inclusão em parafina limpa. Os blocos foram moldados e os cortes, em série, foram feitos utilizando o micrótomo.

5.4.9 Método de coloração Hematoxilina & Eosina (H&E)

As lâminas, com os cortes, foram colocadas na cuba de vidro e, para o processo de desparafinização, foi adicionado Xilol I, esperou-se 5 minutos, e logo após foi adicionado Xilol II, e esperou mais 5 minutos. Terminado o processo, foi iniciado o processo de hidratação, no qual foi utilizada uma bateria de álcoois, Absoluto I, II, III, 95°, 90° e 70°, com intervalo de 1 minuto de um álcool para o outro, em seguida foi deixado em água corrente por 5 minutos. Posteriormente foi adicionada a Hematoxilina, e aguardou por um 1 minuto, foi realizada uma breve passagem pela água, para tirar um pouco do corante, e deixou em água corrente por 5 minutos. Seguidamente foi colocada a Eosina, por 2 minutos, e fez-se uma passagem rápida pela água, cerca de cinco vezes, para sair o corante. No processo de desidratação, novamente foi utilizada uma bateria de álcoois, sendo eles álcool 70°, 90°, 95°, Absoluto I, II e III, por 2 minutos, em seguida foi colocado Xilol I, por 2 minutos, e Xilol II até o momento de colocar a lamínula, 24x60 mm, com auxílio de Entellan.

5.4.9.1 Quantificação de núcleos

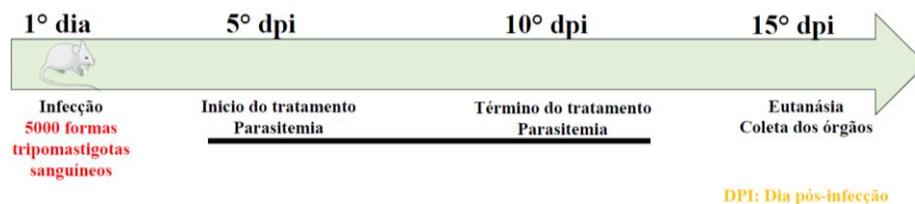
As imagens foram visualizadas com ampliação de 40x (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e digitalizadas pelo software Axion Vision LE (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para cada animal foram obtidas 20 imagens dos tecidos cardíacos. Para a quantificação, foi realizada em cada imagem a contagem dos núcleos com auxílio do software Axion Vision.

5.4.10 Análise estatística dos experimentos *in vivo*

Os resultados dos níveis de parasitemia, área sob a curva de parasitemia e ganho de peso dos animais foram expressos como a média±desvio padrão para cada conjunto de dados. A normalidade dos dados foi investigada pelo teste D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk. Para comparação entre os conjuntos de dados foram usados os testes de ANOVA ou teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram feitas no software *GraphPad Prism 8.0*.

5.4.11 Desenho experimental *in vivo*

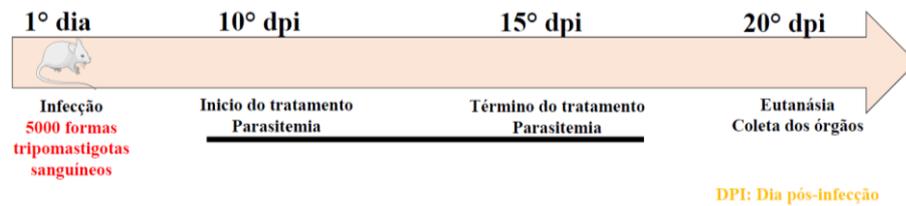
Figura 1 - Desenho experimental do tratamento com ravuconazol e amiodarona na evolução da infecção aguda pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em duas linhagens de camundongos BALB/c e Swiss.



Nota: Os camundongos foram tratados em monoterapia com benznidazol (100mpk), amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk e 10mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk) por 5 dias consecutivos após a confirmação da infecção (5º dia após a inoculação).

Fonte: autor

Figura 2 - Desenho experimental do tratamento com ravuconazol e amiodarona na evolução da infecção aguda pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em camundongos da linhagem BALB/c.



Nota: Os camundongos foram tratados em monoterapia com amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk) por 5 dias consecutivos após a confirmação da infecção (10º dia após a inoculação).

Fonte: autor

6 RESULTADOS

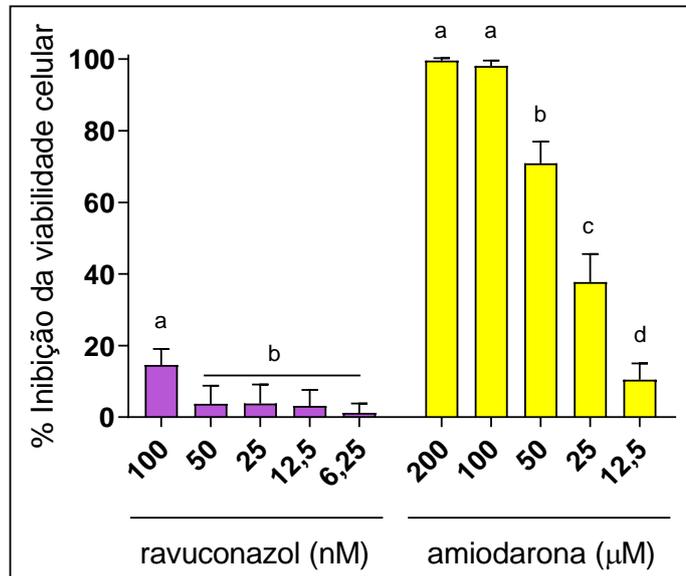
Resultados dos experimentos.

6.1 Estudos *in vitro*

6.1.1 Análise da citotoxicidade dos fármacos em monoterapia e em combinação sobre cardiomiócitos da linhagem H9c2

Primeiramente foi caracterizado o perfil citotóxico do ravuconazol e amiodarona isoladamente e em combinação sobre células H9c2. As concentrações dos fármacos utilizadas foram definidas a partir de dados disponíveis na literatura (URBINA *et al.*, 2003; BENAİM *et al.*, 2006; PLANER *et al.*, 2014). O ravuconazol não apresentou toxicidade relevante nas concentrações testadas, resultando em níveis abaixo de 30% de inibição da viabilidade celular, mesmo na concentração mais alta. De forma diferente, a amiodarona interferiu significativamente na viabilidade das células nas concentrações maiores ou iguais a 25µM (Figura 3).

Figura 3 - Efeito da incubação com ravuconazol e amiodarona na viabilidade de células H9c2.



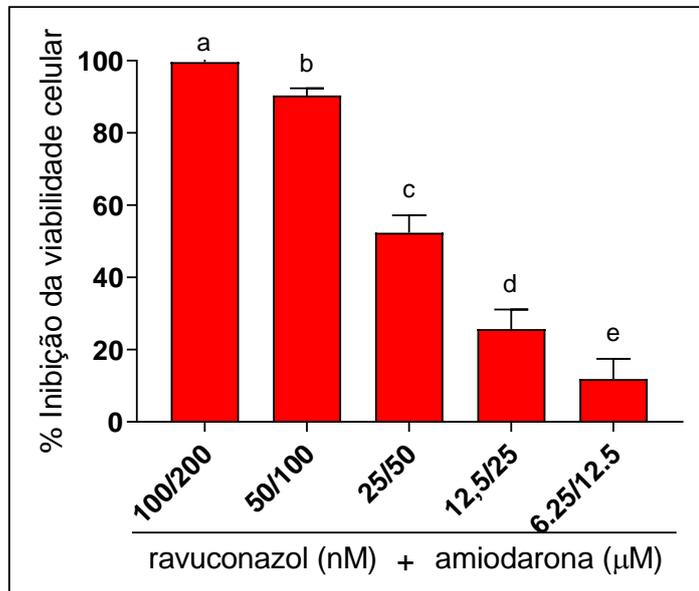
Fonte: autor

Nota: Percentual de inibição da viabilidade de células H9c2 incubadas por 48 horas com diferentes concentrações de ravuconazol e amiodarona. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) para um mesmo fármaco.

O cálculo da CC-50 (concentração dos fármacos que induz 50% de inibição da proliferação das células hospedeiras) resultou nos valores de 28,45µM e 89,63nM para amiodarona e ravuconazol, respectivamente.

Após a análise do perfil citotóxico dos fármacos em monoterapia foi realizada a combinação de ravuconazol e amiodarona com o objetivo de determinar uma possível adição ou atenuação de toxicidade para células de mamíferos. Pode-se observar que não houve toxicidade adicional; na concentração de 12,5nM de ravuconazol + 25µM de amiodarona houve ainda uma leve atenuação do perfil de toxicidade dos fármacos quando combinados (Figura 4).

Figura 4 - Efeito da incubação com ravuconazol + amiodarona na viabilidade de células H9c2



Fonte: autor

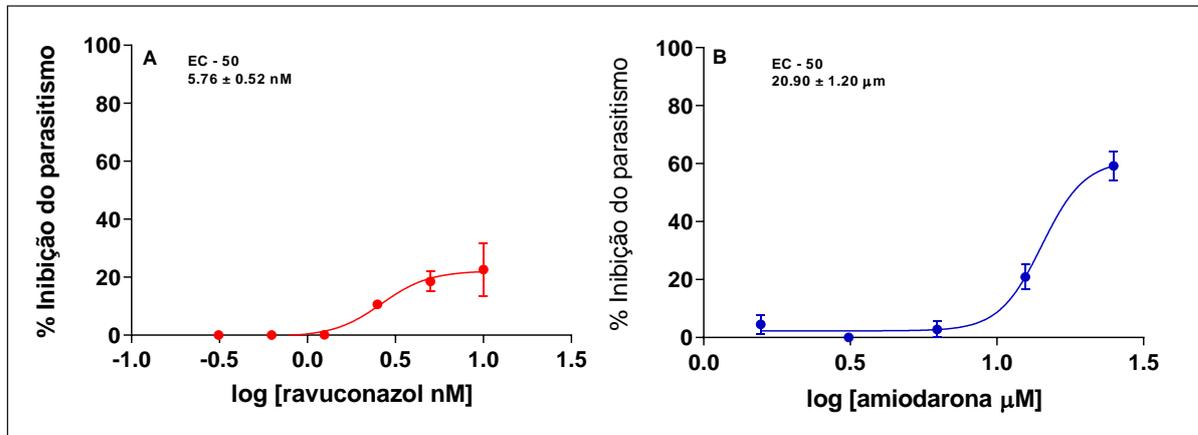
Nota: Percentual de inibição da viabilidade de células H9c2 incubadas por 48 horas com diferentes concentrações de ravuconazol + amiodarona. CNT – células na ausência de fármacos. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os nossos dados indicaram que o ravuconazol não exacerba a toxicidade da amiodarona no modelo experimental avaliado (Figura 4).

6.1.2 Avaliação da atividade anti-*T.cruzi* do ravuconazol e amiodarona utilizando células H9c2

A figura 5 ilustra a inibição do parasitismo observada para diferentes concentrações dos fármacos. O ravuconazol e a amiodarona apresentaram ação anti-*T.cruzi* concentração-dependente sobre as formas amastigotas, resultando em valores de EC-50 de 5.76 ± 0.52 nM e 20.9 ± 1.2 μ M, respectivamente.

Figura 5 - Atividade *in vitro* do ravuconazol e amiodarona, sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



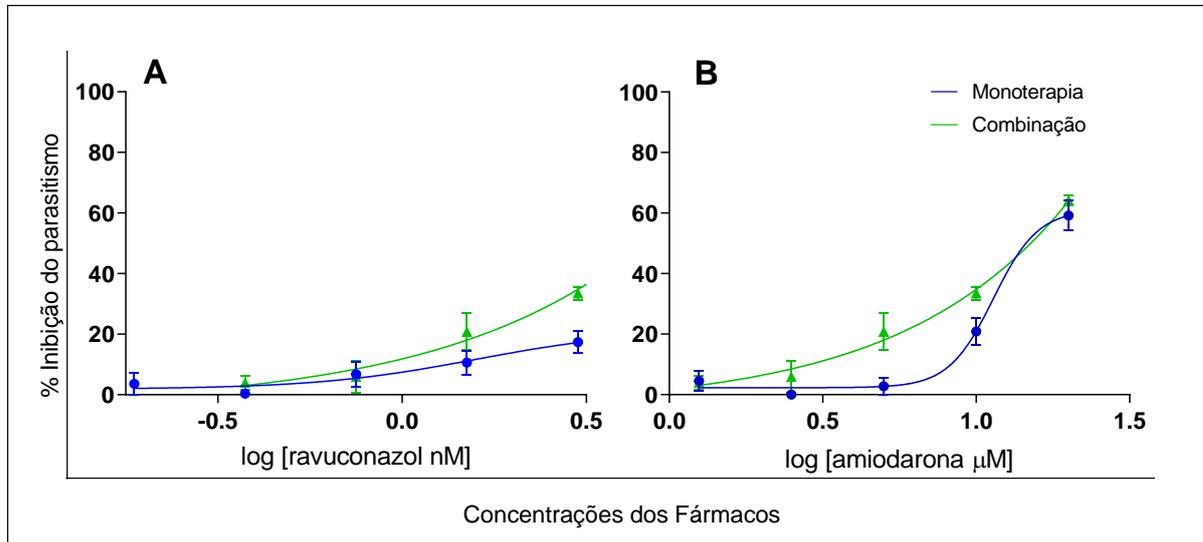
Fonte: autor

Nota: 1×10^4 células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de ravuconazol e amiodarona por 48 horas. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes. A EC-50 foi calculada utilizando-se o *software CompuSyn*.

6.1.3 Análise da natureza da interação entre ravuconazol e amiodarona utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y

A partir dos valores da EC-50 obtidos para cada fármaco foi determinado o perfil de interação entre eles sobre as células previamente infectadas por *T.cruzi*. Considerando o perfil de toxicidade da amiodarona, as concentrações iniciais de cada fármaco usadas na combinação foram similares ao valor de EC-50, sendo 20 μ M para amiodarona e 6nM para o ravuconazol. A figura 6 mostra os perfis das curvas de dose-efeito obtidas para cada fármaco em monoterapia comparativamente à combinação.

Figura 6 - Curvas de dose-resposta representativas da interação *in vitro* entre ravuconazol e amiodarona sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

Nota: 1×10^4 células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de ravuconazol e amiodarona, isoladamente ou em combinação, por 48 horas. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes. A natureza da interação foi identificada por meio dos valores de FIC *fractional inhibitory concentration* obtidos com auxílio do programa *CompuSym*.

O gráfico ilustrado em 6A mostra que o efeito da combinação foi superior à utilização isolada das mesmas concentrações de ravuconazol, já que o percentual máximo de inibição foi cerca de 20% nesse caso, enquanto mais de 40% de inibição foi observado quando utilizada a combinação. No entanto, a figura 6B mostra que a amiodarona isoladamente nas concentrações mais altas induziu efeito similar à combinação, sugerindo efeito aditivo. Para confirmar o perfil de interação entre os fármacos foi calculado o valor de FIC no nível de 50% e 90% de efeito, resultando em 1,37 em ambas as análises, o que confirmou que a natureza da interação entre ravuconazol e amiodarona é indiferente (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores da EC-50 e 90 e o índice de FIC (*fractional inhibitory concentration*) dos fármacos em monoterapia e em combinação sobre as formas amastigotas de *T.cruzi*.

| Fármacos | EC-50 | EC-90 | FIC* (EC-50) | FIC*(EC-90) |
|-----------------------------|--------|-------|--------------|-------------|
| Amiodarona | 27µM | 36µM | 1,37 | |
| Ravuconazol | 2nM | 3,7nM | | |
| Amiodarona (em combinação) | 16,7µM | 23µM | | |
| Ravuconazol (em combinação) | 2nM | 2,8nM | | |

* Valores de FIC<0,5 indicam interação sinérgica; 0.5<FIC<4, aditividade e >4, antagonismo.

Fonte: autor

De forma interessante, o ravuconazol possibilitou uma ligeira redução nos valores de EC-50 e EC-90 estimado da amiodarona, o que poderia ter um impacto positivo na redução do perfil de toxicidade. A EC-90 estimada para a amiodarona usada isoladamente foi 36µM; já quando combinada a concentrações subótimas de ravuconazol esse valor caiu para 23µM (Tabela 4).

Considerando a ausência de toxicidade da combinação entre amiodarona e ravuconazol e o efeito aditivo observado *in vitro*, a próxima etapa foi avaliar o efeito da associação de ravuconazol e amiodarona sobre a infecção de diferentes linhagens de camundongos por uma cepa parcialmente resistente de *T. cruzi*.

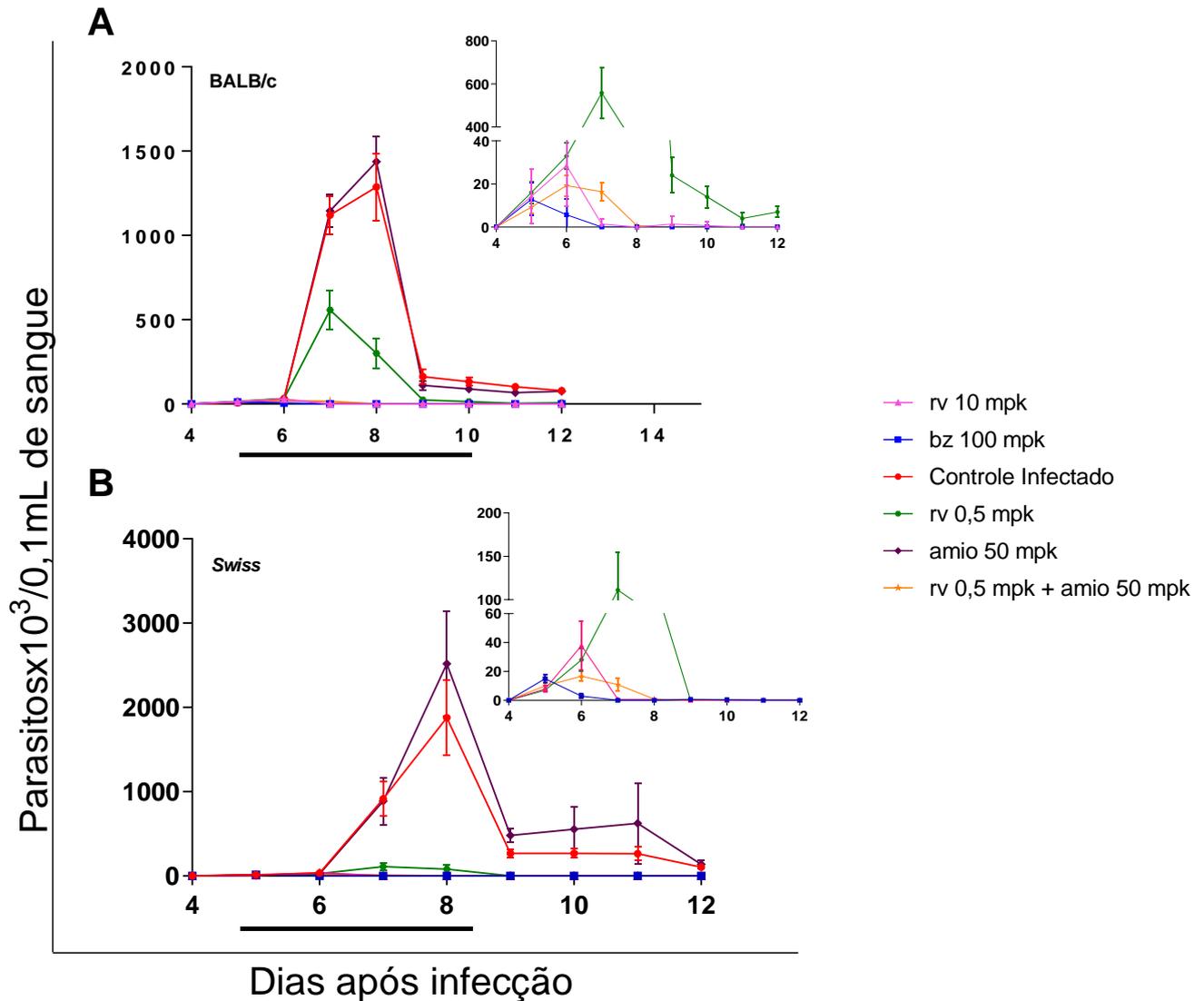
6.2 Ensaios *in vivo*

A avaliação do efeito do ravuconazol e amiodarona isoladamente e em combinação sobre o desenvolvimento da fase aguda da infecção por *T. cruzi* foi avaliada em diferentes modelos experimentais. Os parâmetros utilizados para analisar a capacidade dos fármacos isoladamente e em combinação foram (i)

parasitemia; (ii) ganho de peso; (iii) peso relativo dos órgãos; (iv) interferência no desenvolvimento da miocardite; (v) perfil de citocinas. Esses parâmetros foram analisados comparativamente entre diferentes linhagens de camundongos (BALB/c e *Swiss*) e cepas do parasito (Y e Colombiana).

Inicialmente foram estudados os efeitos dos tratamentos sobre a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. Esta cepa foi escolhida por induzir níveis parasitêmicos elevados, mortalidade precoce e ser parcialmente resistente à terapêutica com benznidazol *in vivo* (FILARDI; BRENER, 1987; CALDAS *et al.*, 2008) sendo frequentemente utilizada para estudos de quimioterapia experimental da doença de Chagas. A figura 7 representa as curvas de parasitemia de camundongos BALB/c e *Swiss* tratados ou não com os fármacos.

Figura 7 - Efeito do tratamento com ravuconazol e amiodarona na evolução da infecção aguda pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em diferentes modelos experimentais.

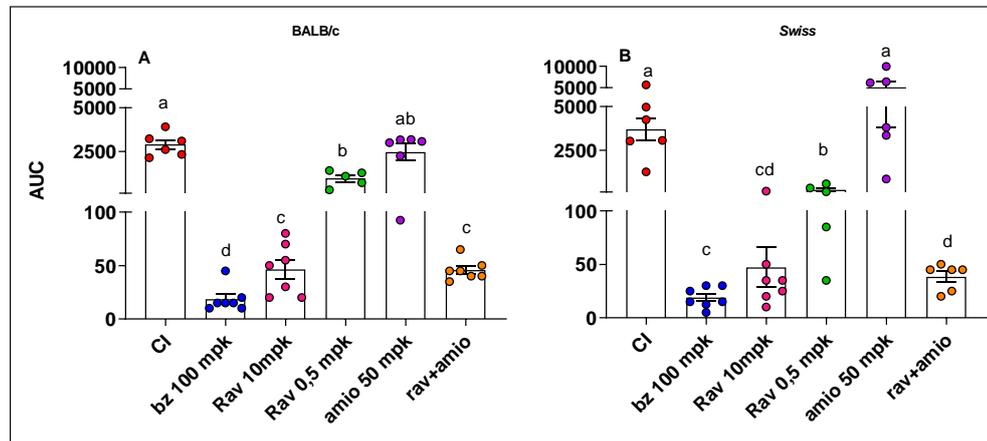


Fonte: autor

Nota: Número de tripomastigotas detectadas em 0,1 mL de sangue de camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi* nos diversos tratamentos. Os camundongos foram tratados em monoterapia com benznidazol (100mpk), amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk e 10mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk) por 5 dias consecutivos após a confirmação da infecção (5º dia após a inoculação) CI – Controle Infectado e não tratado. A) BALB/c B) Swiss. **Os insertos mostram apenas os grupos tratados com subdose de ravuconazol, ravuconazol 10mpk e benznidazol, comparativamente à combinação.** mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal.

Os resultados mostram altos níveis parasitêmicos com pico no 8º dia de infecção nos animais infectados e não tratados, independente da linhagem de camundongo avaliada (Figura 7). Aqueles tratados com a dose-padrão de benznidazol (100mg/Kg), assim como os tratados com a maior dose de ravuconazol (10mg/Kg) tiveram a parasitemia suprimida a partir do 2º dia de tratamento. Por outro lado, a amiodarona não interferiu na multiplicação do parasito, resultando em uma curva de parasitemia com perfil similar ao observado para os animais controle, tanto nos BALB/c quanto nos *Swiss*. De forma interessante, o efeito da administração da subdose de ravuconazol na evolução da infecção foi dependente da linhagem de camundongo, sendo mais eficaz em reduzir o parasitismo dos animais heterogênicos (Figura 7). Nesse sentido, apesar de a subdose de ravuconazol exercer efeito positivo na redução do parasitismo, esse foi menos pronunciado do que o observado para os *Swiss*. Por outro lado, é claramente perceptível o benefício da combinação em interferir na proliferação do parasito nos camundongos de ambas as linhagens. A figura 8 ilustra os valores de área sob a curva de parasitemia (AUC) obtidos para os diferentes grupos experimentais.

Figura 8 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre a parasitemia de camundongos da linhagem BALB/c e Swiss infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

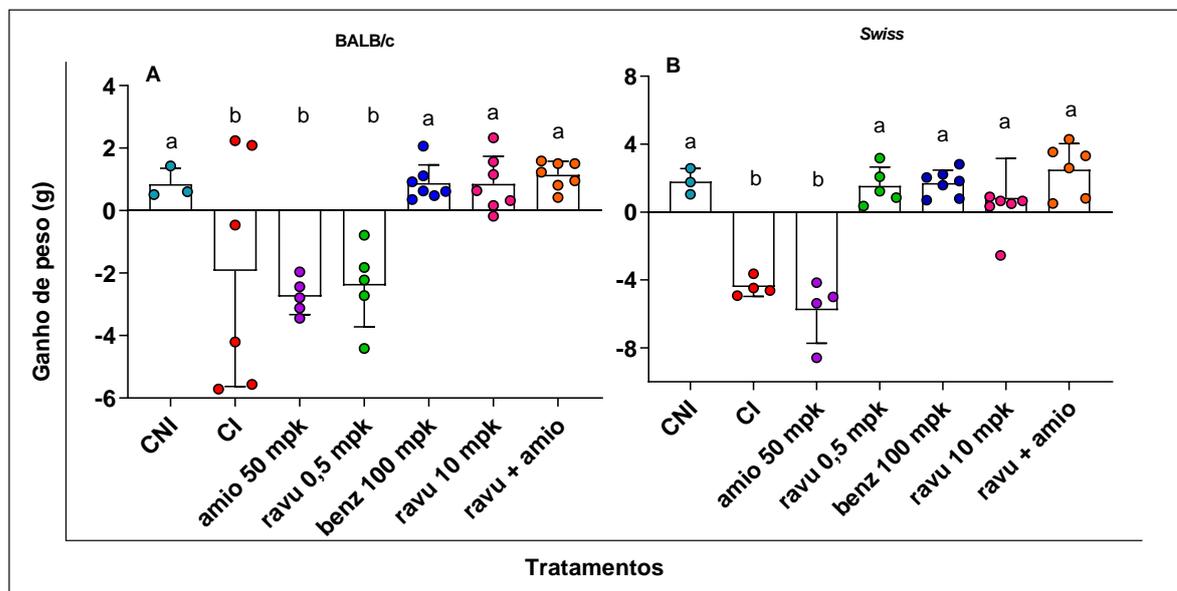
Nota: Área sob a curva de parasitemia (AUC) de camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; monoterapia com benznidazol (100mpk), amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk e 10mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado. (a) animais da linhagem BALB/c; (b) animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os animais da linhagem BALB/c apresentaram diferença estatística no número total de parasitos encontrados entre os grupos tratados em relação ao grupo controle infectado e não tratado, exceto o grupo tratado com amiodarona em monoterapia, que apresentou AUC média similar à observada para o controle. O grupo tratado com ravuconazol (0,5 mpk) apresentou AUC apenas 3 vezes menor que o controle. Por outro lado, a AUC detectada para os camundongos tratados com a combinação de ravuconazol e amiodarona foi 63 vezes menor comparativamente a ausência de tratamento. Já os animais da linhagem Swiss, em relação ao tratamento com amiodarona, apresentaram o mesmo comportamento observado nos camundongos isogênicos. De forma diferente, o grupo tratado com subdose de ravuconazol (0,5mpk) apresentou AUC 16 vezes menor do que o controle infectado, enquanto considerando a terapia combinada essa redução foi de 96 vezes (Figura 8). Quando comparados os valores de AUC observados para as monoterapias com

ravuconazol *versus* as combinações em cada linhagem, podemos afirmar que a associação com amiodarona reduziu em 20 vezes a área sob a curva nos animais isogênicos e em 6 vezes nos heterogênicos (Figura 8).

A capacidade dos diferentes tratamentos em interferir no parasitismo apresentou relação direta com a proteção contra a perda de peso induzida pela infecção (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o ganho de peso de camundongos da linhagem BALB/c e Swiss infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

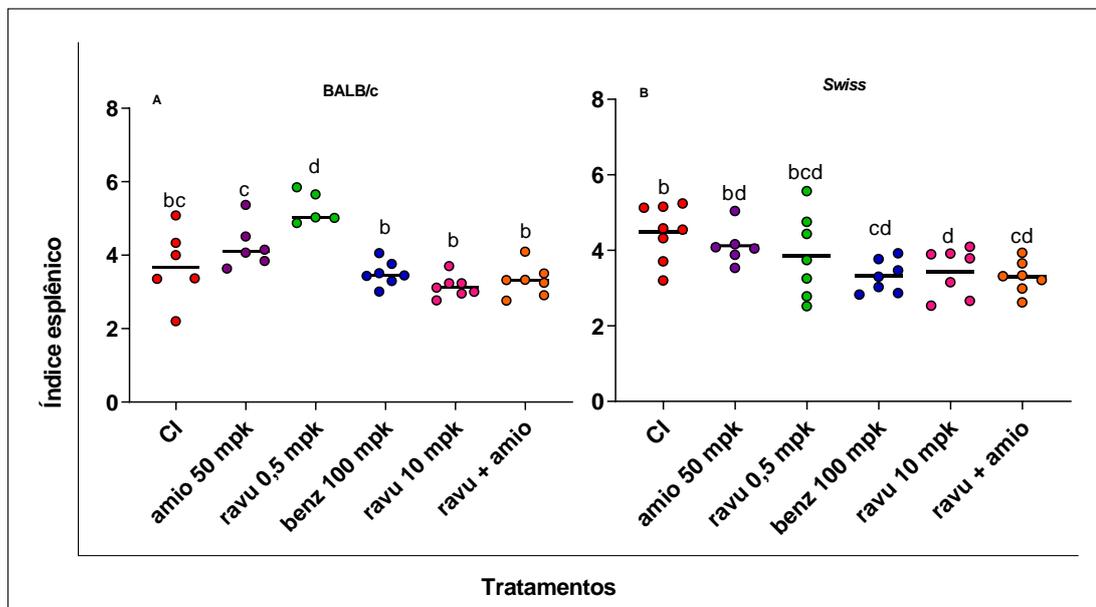
Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; monoterapia com benznidazol (100mpk), amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk e 10mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado; CNI – Controle não infectado. (A) animais da linhagem BALB/c; (B) animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os dados demonstram que a infecção induziu perda de peso em ambas as linhagens. A amiodarona, em acordo com o que foi observado no perfil de parasitemia, não protegeu contra a perda de peso. Já os animais que receberam os tratamentos que induziram supressão da parasitemia (ravuconazol 10mg/Kg, benznidazol e combinação) ganharam peso de forma similar aos animais não

infectados. Os animais da linhagem *Swiss* infectados pela cepa Y apresentaram resultados semelhantes aos observados para a linhagem BALB/c e apenas o grupo tratado com ravuconazol na concentração de 0,5 mpk não apresentou perda de peso acentuada, como mostrado nos animais da linhagem BALB/c. Este interessante resultado pode ser justificado pelos dados apresentados anteriormente que demonstram que o tratamento com a subdose de ravuconazol foi mais eficiente em reduzir o número de parasitos nos camundongos *Swiss* em relação ao BALB/c (Figura 8).

Considerando que na fase aguda da infecção pode ser observada esplenomegalia resultante do intenso parasitismo e estimulação antigênica, realizamos a análise de peso relativo do baço aos 5 dias após o tratamento dos animais, que correspondem a 15 dias após a infecção. As figuras 10 A e B mostram o peso relativo do órgão nos diferentes grupos experimentais das linhagens BALB/c e *Swiss*, respectivamente. O peso relativo do baço demonstrou que a infecção naturalmente estimulou o desencadeamento de aumento no peso do órgão (Figura 10). O parasitismo levou a um aumento de cerca de quatro vezes no índice esplênico ($p < 0.0001$) do controle infectado comparativamente aos animais não infectados independentemente da linhagem do animal. Por outro lado, a supressão da parasitemia, observada nos grupos tratados com benznidazol, ravuconazol na maior dose e combinação, apesar de não ser suficiente para equalizar os valores aos observados para os animais saudáveis, reduziu o índice esplênico comparativamente ao observado para os camundongos tratados com amiodarona (BALB/c) ou infectados e não tratados (*Swiss*). Já os ravuconazol na dose de 0,5 mpk apresentou perfil dependente da linhagem de camundongo, o que tem relação com a AUC. A linhagem BALB/c apresentou índice esplênico superior até mesmo aos animais infectados e não tratados, enquanto nos *Swiss* houve alta heterogeneidade intragrupo e valores similares aos demais grupos (Figura 10).

Figura 10 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o peso relativo do baço de camundongos da linhagem BALB/c e Swiss infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



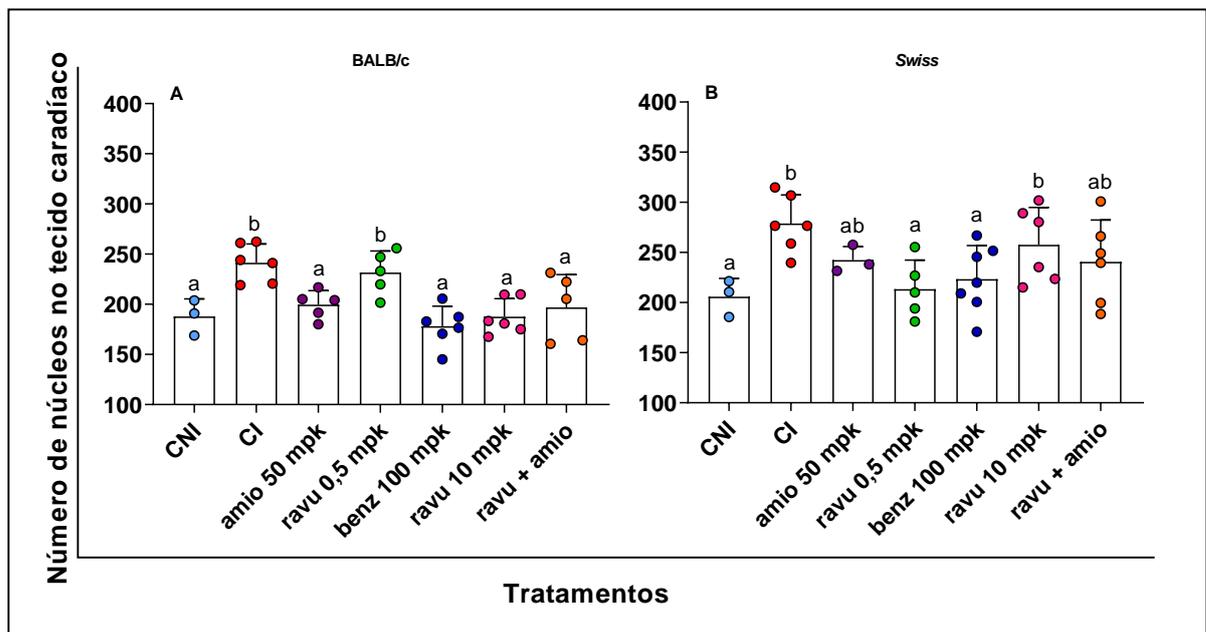
Fonte: autor

Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; monoterapia com benznidazol (100mpk), amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk e 10mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado; CNI – Controle não infectado. (A) animais da linhagem BALB/c; (B) animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). (A) Peso relativo do baço dos animais da linhagem BALB/c; (B) Peso do baço dos animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Além do efeito tripanossomicida, é de grande importância que novos candidatos a fármacos ou mesmo novas estratégias de tratamento apresentem ainda influência positiva no sentido de evitar as lesões características da infecção pelo parasito. Nesse contexto, foi estudada a influência dos diferentes tratamentos no desencadeamento da resposta inflamatória resultante do parasitismo. A figura 11 mostra os resultados da análise quantitativa do número de núcleos do tecido muscular cardíaco nos animais infectados com a cepa Y, tratados com os fármacos isoladamente ou em combinação. Foi quantificado o número de núcleos nos animais

infectados e tratados ou não com relação ao grupo não infectado. Este, naturalmente, não desenvolveu infiltrado inflamatório.

Figura 11 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o processo inflamatório cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c e Swiss infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

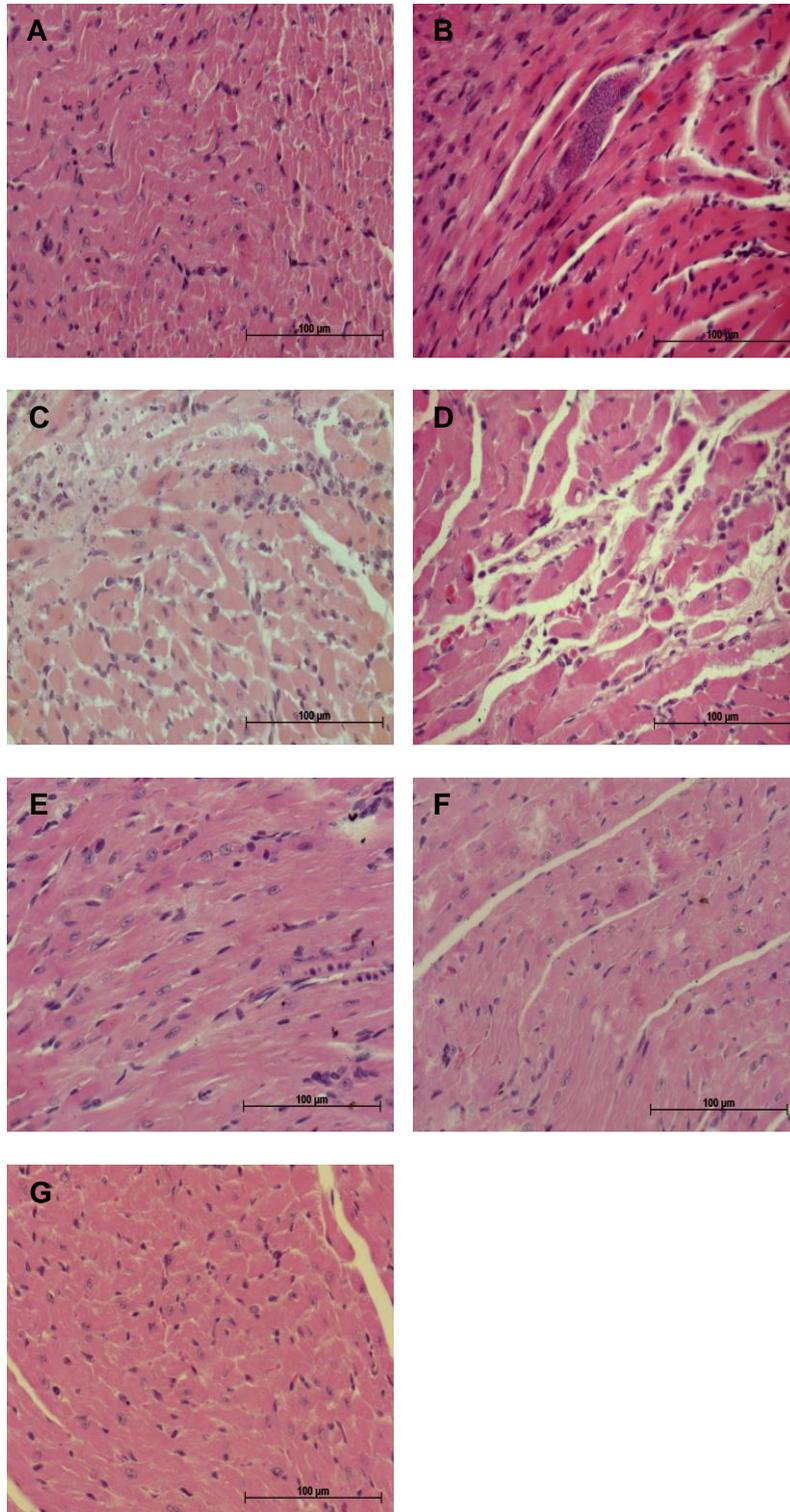
Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; monoterapia com benznidazol (100mpk), amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk e 10mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado; CNI – Controle não infectado. (A) animais da linhagem BALB/c; (B) animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). (A) animais da linhagem BALB/c; (B) animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os animais infectados e não tratados apresentaram celularidade ~1,3 vezes maior comparativamente aos animais não infectados em ambas as linhagens de camundongos estudadas (Figura 11). A influência dos tratamentos em interferir no desenvolvimento da reação inflamatória, em geral, guardou relação com a intensidade da parasitemia (e AUC) (Figura 8), sendo essa relação mais evidente para a linhagem BALB/c. Nesse caso, nos grupos que foi observada redução da parasitemia (benznidazol, ravuconazol 10mpk e combinação), o número de núcleos

foi significativamente menor do que o observado para os animais infectados e não tratados. Para a linhagem *Swiss* houve maior variabilidade intragrupo e os valores foram similares aos animais infectados e aos não infectados. Curiosamente, nos *Swiss*, o tratamento com ravuconazol na dose de 10 mpk, mesmo sendo capaz de reduzir o parasitismo, não interferiu no número de células observada no tecido muscular cardíaco (Figura 11B). Ainda, de forma interessante, o tratamento com amiodarona em monoterapia (50 mpk) não apresentou relação com a parasitemia; mesmo não sendo capaz de reduzir o parasitismo, conseguiu diminuir a celularidade a níveis similares aos animais não infectados (Figura 11A e B). A partir desses dados e considerando a avaliação qualitativa das lâminas, foi realizada uma análise descritiva dos tecidos.

As figuras 12 e 13 mostram fotomicrografias representativas de áreas de lesões encontradas na avaliação qualitativa. São representadas áreas de necrose, conjuntivização e ninhos de amastigotas encontrados ou não para os diferentes grupos. É importante salientar que essas imagens não guardam relação direta com a celularidade observada na figura 11. A figura 12 mostra os diferentes grupos experimentais pertencentes à linhagem BALB/c. Os animais não infectados (Figura 12A) foram utilizados como parâmetros para todas as observações, uma vez que não possuíam nenhuma alteração no miocárdio. O controle infectado (Figura 12B) apresentou intenso processo inflamatório, presença de ninhos de amastigota, cardiomiócitos em apoptose e regiões com deposição de tecido conjuntivo. O grupo tratado com a amiodarona (Figura 12C) em monoterapia não apresentou diferença no número de núcleos em relação aos animais não infectados (Figura 11A), porém podemos observar que o tecido cardíaco apresenta regiões com infiltração leucocitária intensa, deposição de tecido conjuntivo e regiões em necrose. De forma semelhante, o grupo tratado com ravuconazol (0,5 mpk) apresentou intenso processo inflamatório com degeneração de cardiomiócitos (Figura 12D). Os animais tratados em monoterapia com ravuconazol (10 mpk) e benznidazol apresentaram morfologia próxima ao controle não infectado (Figura 12 E-F). De forma interessante podemos observar que a combinação (Figura 12G) conseguiu prevenir os danos cardíacos ficando próxima do tratamento de referência (benznidazol) e do controle não infectado (Figura 12A). Os animais da linhagem *Swiss* apresentaram resultados semelhantes aos descritos para a linhagem BALB/c (Figura 13 A – G).

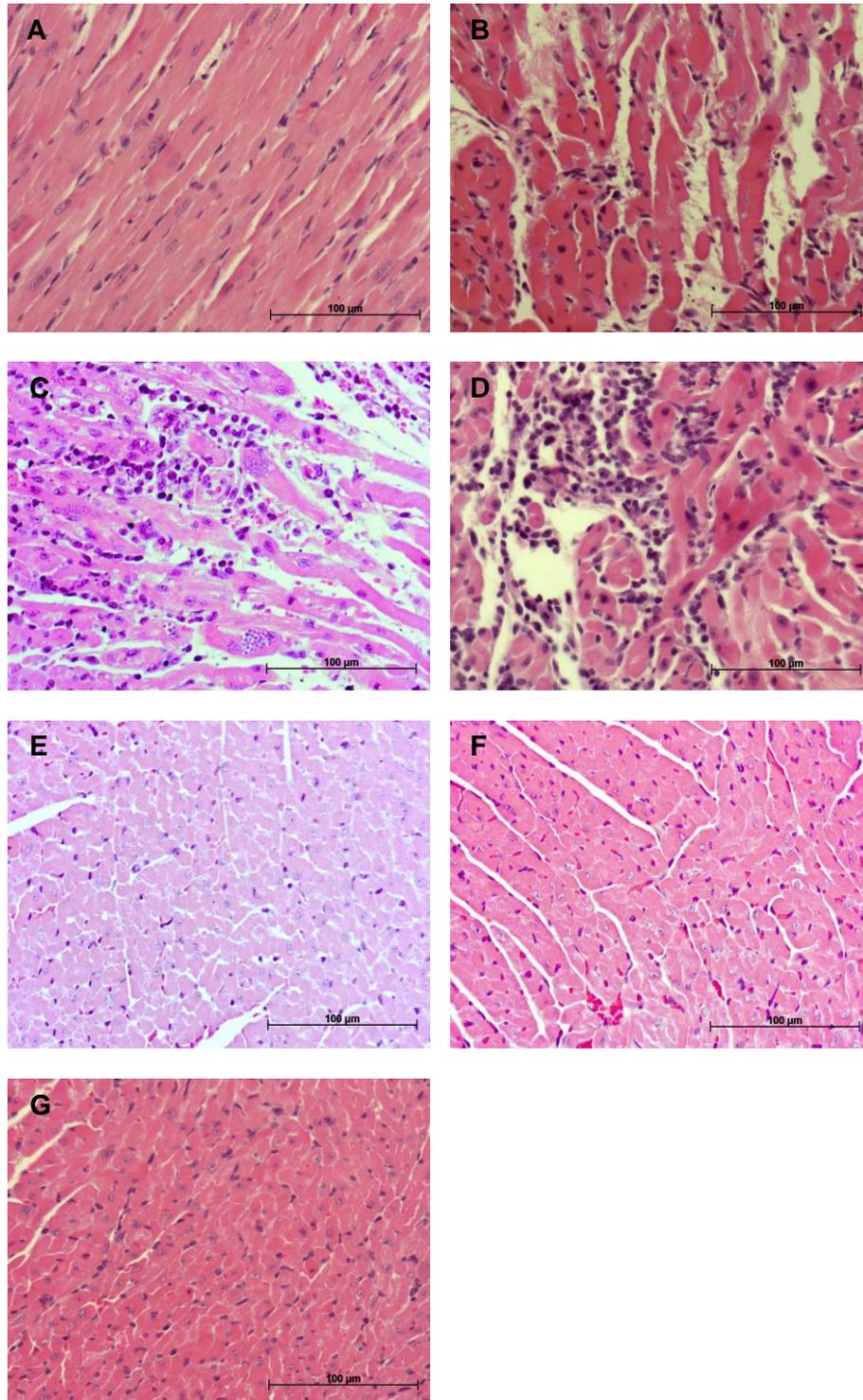
Figura 12 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o tecido cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

Nota: (A) CNI – Controle não infectado; (B) CI – Controle infectado e não tratado; (C) amiodarona (50mpk); (D) ravuconazol (0,5mpk); (E) benznidazol (100mpk); (F) ravuconazol (10mpk); (G) amiodarona (50mpk) + ravuconazol (0,5mpk). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 13 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona e benznidazol isoladamente ou em combinação sobre o tecido cardíaco de camundongos da linhagem Swiss infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.



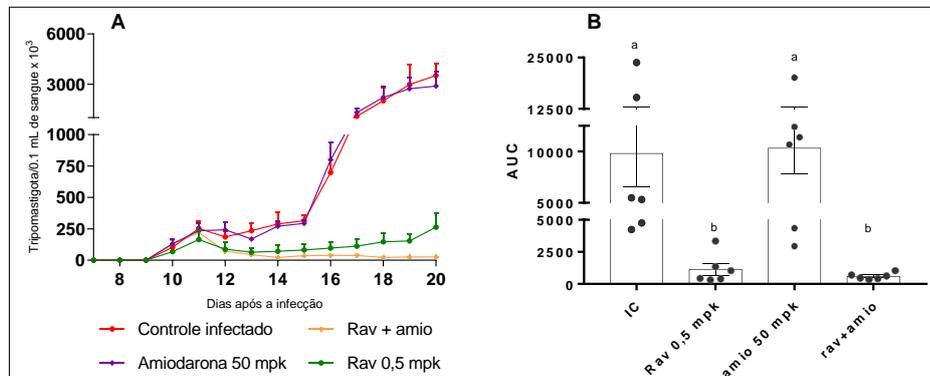
Fonte: autor

Nota: (A) CNI – Controle não infectado; (B) CI – Controle infectado e não tratado; (C) amiodarona (50mpk); (D) ravuconazol (0,5mpk); (E) benznidazol (100mpk); (F) ravuconazol (10mpk); (G) amiodarona (50mpk) + ravuconazol (0,5mpk). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

As diferenças encontradas entre a análise quantitativa para a qualitativa demonstram a variação e quantidade de informações presentes do período inicial da infecção. De forma interessante os resultados se complementam. É importante ressaltar que a eutanásia dos animais foi realizada 5 dias após o término do tratamento; dessa forma, os níveis de parasitismo e infiltrado inflamatório nos animais tratados não correspondem necessariamente aos que seriam observados sob a pressão dos fármacos.

Após estudados os efeitos dos tratamentos sobre a infecção pela cepa Y de *T. cruzi* utilizamos a cepa Colombiana por induzir níveis parasitêmicos elevados e ser resistente à terapêutica com benznidazol (FILARDI; BRENER, 1987; CALDAS *et al.*, 2008). Os seguintes parâmetros foram analisados: (i) parasitemia; (ii) ganho de peso; (iii) peso relativo dos órgãos; (iv) interferência no desenvolvimento da miocardite; (v) perfil de citocinas. A figura 14 representa as curvas de parasitemia e AUC de camundongos BALB/c tratados ou não com os fármacos.

Figura 14 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre a parasitemia de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



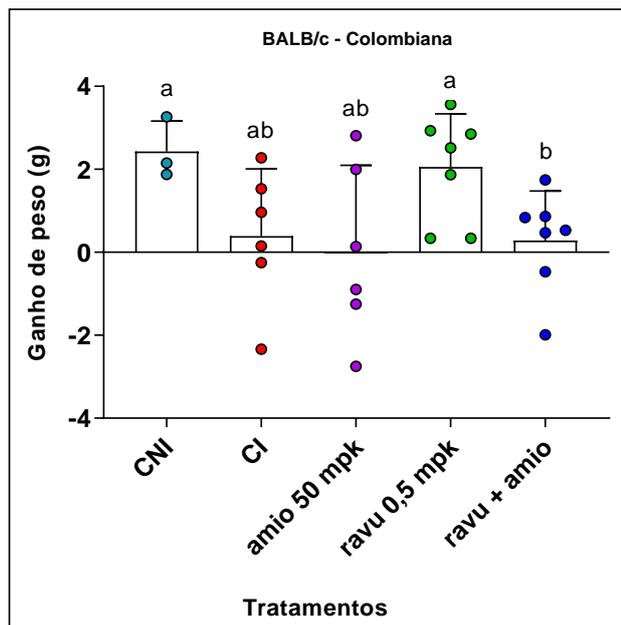
Fonte: autor

Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado. (A) animais da linhagem BALB/c; (B) animais da linhagem Swiss. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). **A-** Número de formas tripomastigotas detectadas no sangue periférico de camundongos infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. **B-** Área sob a curva de parasitemia. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os animais infectados e não tratados apresentaram parasitemia ascendente até o vigésimo dia após a infecção (Figura 14A), perfil característico da cepa (CAMANDARROBA *et al.*, 2003). O tratamento com amiodarona em monoterapia apresentou o mesmo comportamento, não apresentando diferença estatística em relação ao controle infectado e não tratado. Curiosamente, o ravuconazol em subdose foi eficaz em interferir significativamente na evolução da infecção, reduzindo drasticamente os níveis parasitêmicos no período observado, assim como a combinação (Figura 14A). A figura 14B mostra os valores de AUC obtidos no período analisado. É notável que a combinação foi eficaz em reduzir a parasitemia, mas, dado o efeito pronunciado do ravuconazol (reduziu em quase 9 vezes a AUC comparativamente ao controle não tratado), os valores de AUC nesses grupos foram similares; quando comparado com a monoterapia, a AUC observada para a combinação foi 1,6 vezes menor (Figura 14B).

A figura 15 ilustra os valores de ganho de peso obtidos para os diferentes grupos experimentais.

Figura 15 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o ganho de peso de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



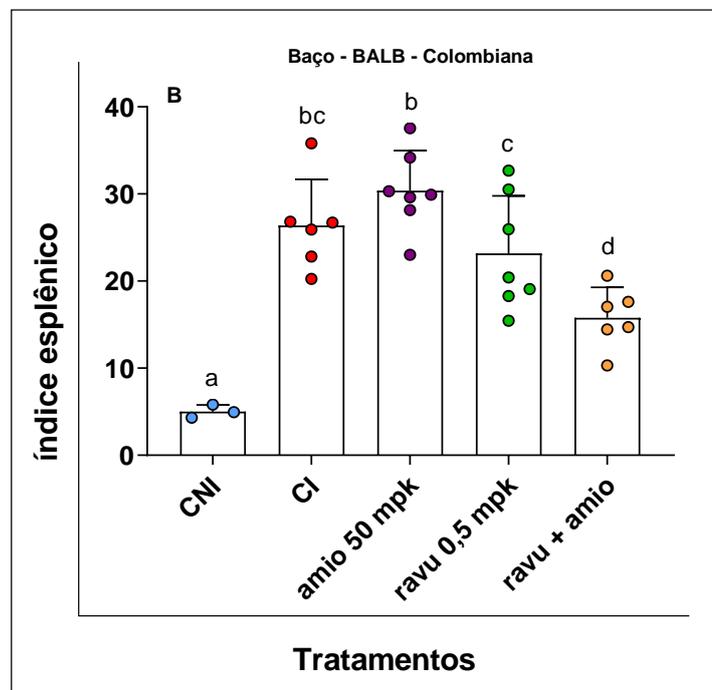
Fonte: autor

Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado; CNI – Controle não infectado. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Diferente do que foi observado para a cepa Y (Figura 9), a maior parte dos camundongos infectados com a cepa Colombiana e não tratados não apresentou perda de peso (Figura 15). Perfil similar foi observado para a amiodarona. De forma interessante, nenhum animal tratado com a subdose de ravuconazol perdeu peso, enquanto a combinação, que também foi efetiva em reduzir a carga parasitária (Figura 14B) não evitou a perda de peso dos animais tratados (Figura 15).

A figura 16 representa os dados de peso relativo do baço dos animais infectados e tratados ou não. A análise demonstra que o índice esplênico dos animais infectados foi significativamente maior do que o observado para aqueles não infectados.

Figura 16 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o peso relativo do baço de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

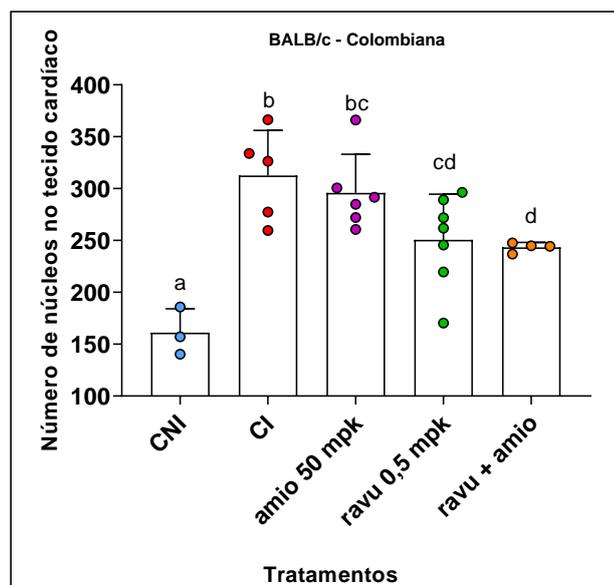
Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado; CNI – Controle não infectado. Peso relativo do baço dos animais da linhagem BALB/c. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Novamente, os resultados estão em acordo com o que foi observado em termos de parasitemia. Os animais tratados com ravuconazol apresentaram índice esplênico menor do que o observado naqueles infectados e não tratados. De forma interessante, a combinação, apesar de reduzir a carga parasitária de forma similar

ao ravuconazol 0,5mpk (Figura 14B), foi estatisticamente diferente de todos os grupos em relação ao índice esplênico, sendo a que mais se aproximou do controle não infectado (Figura 16).

A figura 17 apresenta os dados relacionados a quantificação da celularidade no tecido cardíaco dos animais da linhagem BALB/c infectados com a cepa Colombiana.

Figura 17 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o processo inflamatório cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

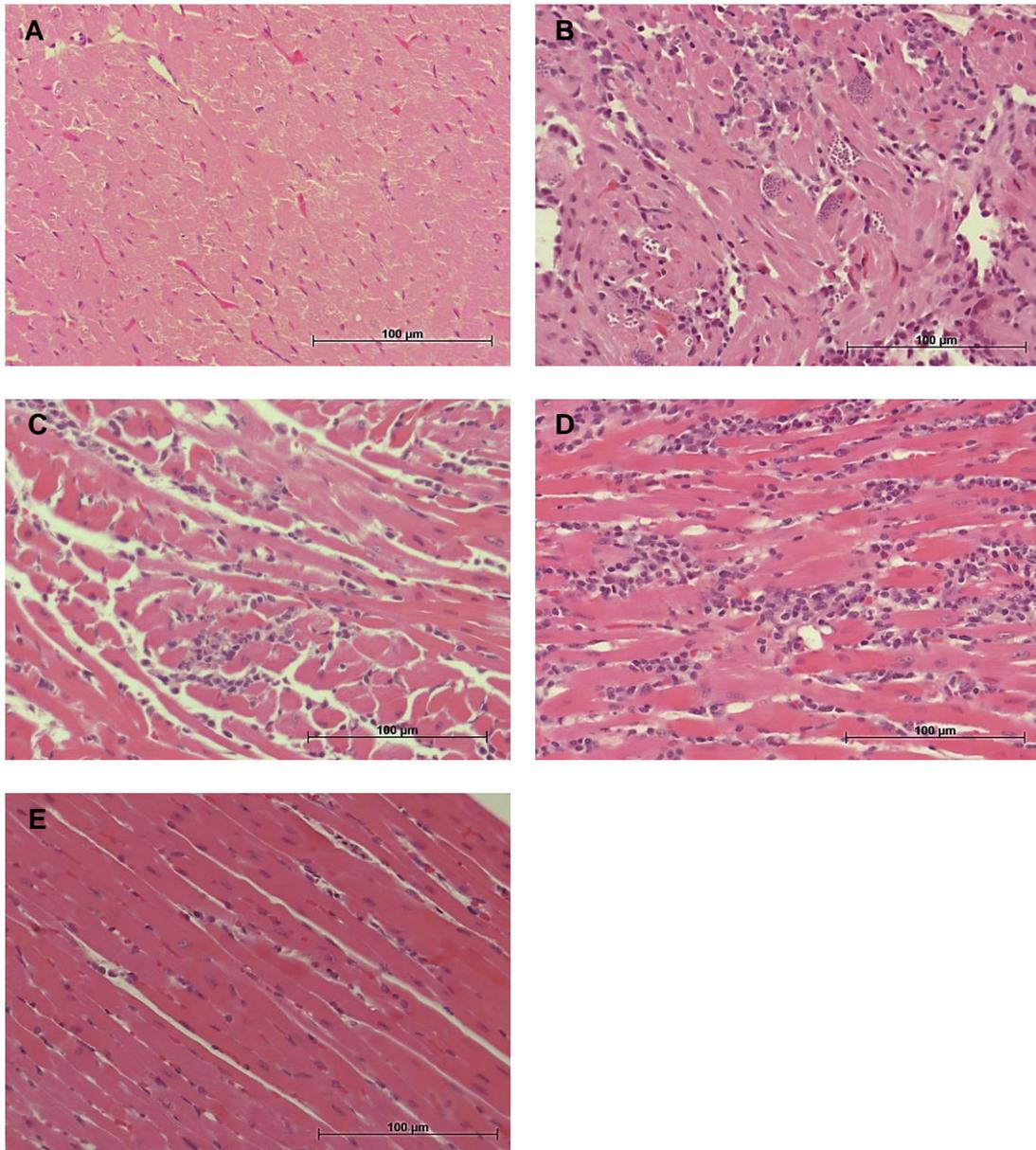
Nota: Mpk- miligramas de droga por quilograma de peso corporal; amiodarona (50mpk), ravuconazol (0,5mpk) e em combinação com ravuconazol (0,5mpk) + amiodarona (50mpk); CI – Controle Infectado; CNI – Controle não infectado. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

A quantificação de núcleos no miocárdio demonstra que os animais infectados tratados ou não, apresentaram um número de núcleos elevado quando comparado com o controle não infectado. O grupo tratado com a monoterapia de amiodarona não apresentou diferenças do controle infectado e dos camundongos tratados com

ravuconazol em monoterapia. A combinação foi significativamente diferente do controle infectado ($p < 0,0168$) e da monoterapia de amiodarona ($p < 0,0249$) sendo semelhante a monoterapia de ravuconazol (Figura 17).

A figura 18 apresenta imagens ilustrativas do tecido cardíaco dos animais da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana. Analisamos qualitativamente os seguintes parâmetros (i) infiltrado inflamatório; (ii) necrose; (iii) presença de tecido conjuntivo. A figura 18A representa o tecido cardíaco dos animais não infectados, esta imagem foi utilizada como parâmetro para todas as análises. Os animais infectados e não tratados apresentaram intenso processo inflamatório, cardiomiócitos em degeneração, presença de ninhos de amastigotas e regiões com deposição de tecido conjuntivo (Figura 18B). Os animais tratados com a monoterapia de amiodarona apresentam diversos infiltrados inflamatórios e cardiomiócitos em processo de degeneração, ficando próxima ao controle infectado (Figura 18C). Os animais tratados com ravuconazol (0,5 mpk) também apresentam regiões com presença de células inflamatórias, presença de ninhos e necrose (Figura 18D). O tecido dos animais tratados com a combinação apresenta pequenos infiltrados inflamatórios, porém diferentemente dos outros grupos a morfologia se aproxima do controle não infectado (Figura 18E).

Figura 18 - Efeito do tratamento com ravuconazol, amiodarona isoladamente ou em combinação sobre o tecido cardíaco de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: autor

Nota: (A) CNI – Controle não infectado; (B) CI – Controle infectado e não tratado; (C) amiodarona (50mpk); (D) ravuconazol (0,5mpk); (E) amiodarona (50mpk) + ravuconazol (0,5mpk).

7 DISCUSSÃO

Nos últimos anos o campo da quimioterapia da doença de Chagas vem sofrendo grandes mudanças. Estudos clínicos envolvendo fármacos de referência e moléculas promissoras trouxeram novas perspectivas e ampla discussão para a pesquisa pré-clínica; especialmente importantes são os resultados de falha terapêutica dos azólicos ravuconazol e posaconazol em induzir cura na doença humana (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). A realização desses estudos significou um avanço na área, considerando que foram as primeiras avaliações clínicas robustas de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas em décadas (URBINA, 2015). Por outro lado, a ineficácia desses antifúngicos no tratamento dos pacientes, dissociadamente do que foi observado em modelos experimentais, propõe reflexões acerca dos modelos experimentais utilizados. Ainda, considerando a alta atividade tripanossomicida intrínseca dessas moléculas, os resultados dos estudos clínicos sinalizam que outras alternativas devem ser buscadas, incluindo regimes terapêuticos otimizados e/ou a utilização combinada a outros fármacos (FÜGI *et al.*, 2014; MOLINA *et al.*, 2014; URBINA, 2015; TORRICO *et al.*, 2018).

No presente estudo mostramos os efeitos da combinação de ravuconazol e amiodarona, comparativamente às monoterapias, sobre a infecção por *T. cruzi*. A escolha da amiodarona foi pautada em evidências disponíveis na literatura, as quais investigaram o impacto da utilização deste antiarrítmico na infecção por *T. cruzi*. Em 2006, Benaim e colaboradores descreveram a atividade tripanossomicida da molécula, sugerindo que os pacientes chagásicos tratados com o antiarrítmico poderiam ter como benefício adicional a redução da carga parasitária. Ainda, identificaram efeito sinérgico de sua utilização com posaconazol, indicando que poderia haver aumento da atividade antiparasitária com o uso de tal combinação (BENAIM *et al.*, 2006). A partir de então, diversos estudos no contexto pré-clínico *in silico* (BELLERA *et al.*, 2013); *in vitro* (BENAIM *et al.*, 2006; URBINA, 2009; LOURENÇO *et al.*, 2018; PINTO-MARTINEZ *et al.*, 2018), *in vivo* (BENAIM *et al.*, 2006; PANIZ-MONDOLFI *et al.*, 2009; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012; MADIGAN *et al.*, 2019) e clínico (CARMO *et al.*, 2015; BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017; STEIN *et al.*, 2018; Clinical trials.gov NCT03193749) foram realizados com o objetivo

de verificar o impacto da amiodarona em monoterapia, bem como em combinação com azólicos (BENAIM *et al.*, 2006; PANIZ-MONDOLFI *et al.*, 2009; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012; PLANER *et al.*, 2014; MADIGAN *et al.*, 2019) na infecção por *T. cruzi*. Adicionalmente moléculas derivadas da amiodarona estão sendo estudadas (BENAIM; PANIZ MONDOLFI, 2012; PINTO-MARTINEZ *et al.*, 2018). No entanto, apesar desse expressivo número de publicações que abordam o uso amiodarona no contexto da doença de Chagas, a análise desses estudos revela resultados discordantes ou pouco claros acerca da real eficácia do fármaco.

Considerando o exposto, inicialmente realizamos avaliações *in vitro* para determinar o perfil citotóxico e a natureza da interação resultantes da associação entre amiodarona e o ravuconazol. Os resultados mostraram que a amiodarona foi tóxica para células de mamíferos apresentando CC-50 $\sim 28\mu\text{M}$. Esse resultado é corroborado por outros estudos que encontraram valores de CC-50 de $12,6 \pm 16,4\mu\text{M}$ em fibroblastos murinos (Planer *et al.* 2014) e $39,5 \pm 2,4 \mu\text{M}$ sobre células Vero (Pinto *et al.* 2018). Roth e Benaim demonstram que o perfil citotóxico deste fármaco pode estar relacionado com o metabólito ativo, a N-desetilamiodarona, o qual possui atividade antiarrítmica e potencializa a toxicidade *in vitro* (BENAIM *et al.*, 2006 ; PANIZ MONDOLFI, 2012; ROTH *et al.*, 2013). Por outro lado, o ravuconazol não apresentou toxicidade, como já demonstrado na literatura (URBINA *et al.*, 2003; URBINA; DOCAMPO, 2003; DINIZ *et al.*, 2018) e não aumentou o perfil citotóxico da amiodarona. De forma similar, Benaim *et al.* (2006), ao associarem o antiarrítmico com o posaconazol, um medicamento da mesma classe farmacológica do ravuconazol, não observaram efeitos tóxicos adicionais.

A seguir, o efeito de concentrações não tóxicas de ravuconazol e amiodarona, isoladamente e em combinação, foi avaliado usando cardiomiócitos da linhagem H9c2 infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Os resultados obtidos confirmaram a elevada potência do ravuconazol em interferir na proliferação de formas intracelulares do parasito (URBINA *et al.*, 2003; URBINA, 2009; DINIZ *et al.*, 2010) enquanto sua atividade sobre tripomastigotas foi muito limitada (dados não mostrados). Já a amiodarona foi ativa contra ambas as formas evolutivas em escala micromolar, com EC-50 em amastigotas de $20.9\pm 1.2\mu\text{M}$. Outros autores identificaram valores de EC-50 que variaram de 1,7 a $8,0\mu\text{M}$ sobre formas amastigotas (BENAIM *et al.*, 2006; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012; PLANER *et al.*,

2012; PINTO *et al.*, 2018). Estas diferenças podem estar relacionadas à utilização de diferentes cepas (MORAES *et al.*, 2014) e tempo de interação com o parasito previamente ao tratamento (DINIZ *et al.*, 2018), bem como tempo de incubação do fármaco com as células. Em nosso estudo o tempo de incubação com os fármacos foi de 48 horas. É sabido que a atividade anti-*T. cruzi* do ravuconazol (MORAES *et al.*, 2014) e amiodarona (ADESSE *et al.*, 2010) é concentração e tempo-dependente. A opção pelo protocolo de 48 horas teve como objetivo fornecer uma noção mais acurada sobre a atividade anti-amastigota (isto é, *endpoint* do experimento antes do período necessário para liberação de tripomastigotas) que acreditamos constituir uma estratégia adequada para avaliação inicial da interação entre os fármacos.

Com relação à natureza da interação entre o ravuconazol e a amiodarona, nossos resultados mostraram efeito aditivo no modelo estudado, células H9c2 infectadas pela cepa Y. Planer *et al.* (2014) estudaram a combinação de amiodarona e posaconazol sobre amastigotas da cepa Tulahuen, obtendo valor de FIC= 1,61, valor próximo do que obtivemos (FIC=1,37; Tabela 4). De forma diferente, Benaim *et al.* (2006) e Veiga-Santos *et al.* (2012) obtiveram FICs <0,5 para a mesma combinação sobre a cepa Y, indicando interação sinérgica. As divergências de metodologias para os estudos das combinações e os poucos dados relacionados aos modelos experimentais podem influenciar diretamente nos resultados obtidos (ROMANHA *et al.*, 2010; CHATELAIN; KONAR, 2015). Outro ponto relevante, além dos fatores já discutidos, pode estar relacionado à escolha do tipo celular hospedeiro. Benaim *et al.* (2006) utilizaram células Vero, as quais recentemente foram descritas como mais susceptíveis a fármacos (FRANCO *et al.*, 2019); enquanto Veiga-Santos *et al.* (2012) utilizaram macrófagos peritoneais, células que podem apresentar maior concentração intracelular do fármaco devido à capacidade de fagocitose; já Planer *et al.* (2014) utilizaram fibroblastos T3T murinos. Na ausência de protocolos padrão, a utilização de condições experimentais distintas, somada à grande heterogeneidade do parasito e sua capacidade de infectar diversos tipos celulares, resulta na variabilidade observada nos parâmetros utilizados para avaliar o efeito dos fármacos, como EC-50 e EC-90, mesmo para os medicamentos de referência. Definições claras de como a infecção de diferentes tipos celulares pode influenciar na resposta aos fármacos constituem uma questão a ser elucidada e de grande impacto na quimioterapia experimental da doença de

Chagas e especialmente importantes no estabelecimento de estratégias de avaliação de combinações de fármacos *in vitro* que apresentem maior valor preditivo (Almeida *et al.*, em publicação).

Apesar de a amiodarona apresentar atividade tripanossomicida *in vitro*, ela não foi efetiva em interferir na infecção aguda pelo parasito nas linhagens de camundongos e cepas avaliadas em nosso estudo. Esses resultados discordam de Benaim *et al.* (2006), que demonstraram que a amiodarona na dose de 50 mg/Kg de peso corporal foi eficaz em reduzir a parasitemia de camundongos NMRI infectados pela cepa Y; no entanto, no referido estudo o tratamento foi iniciado apenas 24 horas após a infecção. Já Castilho (2016), utilizando camundongos da linhagem BALB/c infectados pela cepa Y e tratados com 90mg/Kg do antiarrítmico, 24 horas após a infecção, não observaram efeito do fármaco sobre a parasitemia; entretanto, os autores administraram o fármaco diluído na água, *ad libitum* (CASTILHO, 2016). Notavelmente, as variações nas estratégias experimentais utilizadas podem colaborar para as discordâncias entre os resultados.

Considerando o exposto, soma-se à pauta da pesquisa pré-clínica da doença de Chagas a busca pela padronização de modelos experimentais *in vivo*, o que poderia possibilitar uma maior robustez da pesquisa translacional (ROMANHA *et al.*, 2010; CHATELAIN; KONAR, 2015; CHATELAIN, 2017). A enorme variabilidade existente nas estratégias de avaliação contribui para gerar vieses e limitação na pesquisa pré-clínica (CHATELAIN; KONAR, 2015). Considerando especificamente os modelos murinos, largamente utilizados nos estudos de quimioterapia experimental da doença de Chagas (LANA, 2017), podem ser citadas algumas das variáveis: cepa do parasito, via de inoculação, tempo para início e duração do tratamento, vias de administração dos fármacos, critérios de cura, estágio da doença e linhagem dos camundongos (ROMANHA *et al.*, 2010).

A escolha da linhagem do hospedeiro para experimentação animal é de grande relevância, pois guarda relação com os perfis de suscetibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção (LEÓN *et al.*, 2017). Diversas linhagens isogênicas são utilizadas em estudos experimentais da infecção por *T. cruzi*, como BALB/c, A/J, DBA-2, C3H/He, C57Bl/6, dentre outras (BŁYSZCZUK, 2019). Dentre os animais heterogênicos, camundongos Swiss são amplamente utilizados

sobretudo em estudos de quimioterapia experimental (BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014; CHATELAIN; KONAR, 2015).

Os camundongos isogênicos são considerados mais susceptíveis a infecção comparativamente aos heterogênicos (EHRCHEN *et al.*, 2004); no entanto, dentre os primeiros, a susceptibilidade ao parasito pode ser amplamente variável (TRISCHMANN, 1986). Camundongos heterogênicos apresentam uma elevada variabilidade genotípica e fenotípica, a qual enquanto pode levar a limitações na interpretação de resultados, também é relevante em estudos de quimioterapia experimental, visto que a heterogeneidade do hospedeiro é um fator limitante no sucesso da terapia na doença de Chagas (MOROÇOIMA *et al.*, 2012).

Em nosso estudo foram utilizadas as linhagens BALB/c e *Swiss*. É importante salientar que os animais foram mantidos no mesmo ambiente, receberam simultaneamente e de forma padronizada o inóculo pela cepa Y e, na ocasião do tratamento, os fármacos administrados pertenciam ao mesmo lote, a fim de possibilitar a comparação. Os resultados mostraram diferenças marcantes, particularmente com os esquemas incapazes de suprimir o parasitismo. O perfil da curva de parasitemia e valores de AUC observados para os animais não tratados foi similar para ambas as linhagens; da mesma forma, os tratamentos estabelecidos como referência, com benznidazol na dose padrão, 100mg/Kg (FILARDI; BRENER, 1987) e ravuconazol na dose ótima, 10mg/Kg (URBINA *et al.*, 2003; DINIZ *et al.*, 2018) foram igualmente eficazes na supressão da parasitemia, independente do background genético do hospedeiro. Por outro lado, a eficácia da subdose de ravuconazol (0,5mg/Kg) em reduzir a parasitemia foi dependente da linhagem, sendo a AUC observada nos BALB/c tratados com essa subdose significativamente maior ($p < 0,05$) do que a observada para os *Swiss*, com reflexo também na perda de peso dos animais (Figuras 8 e 9). Curiosamente, a parasitemia observada nos animais tratados com amiodarona foi significativamente maior nos camundongos *Swiss* ($p < 0,05$). Esses dados indicam que a resposta aos fármacos pode ser influenciada pelo background genético do hospedeiro, o qual tem sido estudado principalmente no âmbito da resposta imune e resistência à infecção por *T. cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2018), apontando a linhagem BALB/c como susceptível e a C57BL/6 como resistente à infecção por *T. cruzi* (revisto por Lana 2017), enquanto os dados relacionados à resposta imune nos *Swiss* são absolutamente escassos

(ANDRADE *et al.*, 1985; SOUSA; ALENCAR, 1984). No entanto, apesar da sua importância, a genética do hospedeiro não tem sido explorada nos estudos de quimioterapia experimental, nos quais a variabilidade das cepas do parasito tem sido priorizada (CHATELAIN *et al.*, 2015). O perfil de citocinas dos camundongos em nosso estudo ainda está sendo determinado (por citometria de fluxo) e contribuirá para o entendimento da resposta diferencial das linhagens aos tratamentos.

Apesar do comportamento diferenciado das linhagens quanto ao desenvolvimento da infecção e resposta à amiodarona e a subdose de ravuconazol, o efeito da combinação em reduzir o parasitismo foi superior ao observado para as monoterapias igualmente em ambas as linhagens, sendo ainda mais evidente para os BALB/c, com redução de 20 vezes na AUC nos animais tratados com a combinação comparativamente à monoterapia com o azólico. Ainda, o efeito da administração de ravuconazol 0,5mg/Kg quando associado à amiodarona foi similar à utilização do primeiro na dose ótima (10mg/Kg).

Esses resultados mostram claramente que há uma interação positiva entre os fármacos *in vivo* e estão em acordo com o efeito observado para associações de amiodarona e derivados azólicos em modelos experimentais (BENAIM *et al.*, 2006; PANIZ-MONDOLFI *et al.*, 2009; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012; PLANER *et al.*, 2014; MADIGAN *et al.*, 2019). Uma das hipóteses para interação entre a amiodarona e ravuconazol é a alteração da homeostase de cálcio, fato que poderia explicar o sinergismo entre os dois medicamentos; outra possível via de interação é que a amiodarona, assim como os azólicos, tem efeito na inibição da via de biossíntese de ergosterol (BENAIM *et al.*, 2006, 2012). Alternativamente, mecanismos relacionados a interações farmacocinéticas, ainda não explorados, poderiam contribuir para o entendimento do efeito positivo resultante da utilização combinada entre ravuconazol e amiodarona.

Os resultados acima discutidos contribuem para o entendimento que a combinação de fármacos é uma abordagem interessante no desenvolvimento de novas alternativas para a terapêutica doença de Chagas, especialmente considerando a escassez de moléculas que apresentam potencial terapêutico demonstrado em avaliações pré-clínicas. Nesse contexto, essa estratégia tem sido amplamente investigada em estudos pré-clínicos e mesmo clínicos, com a avaliação recente de combinações de E1224 (ou fosravuconazol) e benznidazol (BENDITA;

BRIEFING, 2019) e posaconazol e benznidazol (MORILLO *et al.*, 2017). De forma paradoxal, pouco tem sido discutido acerca dos protocolos utilizados para investigar a interação *in vivo* entre diferentes moléculas na infecção experimental por *T. cruzi*.

Grande parte dos experimentos de combinação de fármacos na quimioterapia experimental da doença de Chagas, incluindo aqueles que avaliaram associações envolvendo azólicos, empregaram doses ótimas, naturalmente com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica. No entanto, esta estratégia pode dificultar uma definição clara do efeito da combinação quando um dos fármacos apresenta alta atividade anti-*T. cruzi*, sendo necessário longo follow-up. Por outro lado, alguns estudos que utilizaram subdoses evidenciam a limitação de extrapolar os efeitos relacionados ao potencial terapêutico, considerando que foram usadas doses abaixo das necessárias para atingirem níveis ótimos (STRAUSS *et al.*, 2018). Ainda, em alguns casos utilizando tratamento com subdoses, apenas dados de parasitemia e mortalidade foram coletados, negligenciando os efeitos relacionados à resposta do hospedeiro (DINIZ *et al.*, 2013; PLANER *et al.*, 2014). Na tentativa de estabelecer uma estratégia de avaliação otimizada para investigar o perfil de interação entre fármacos *in vivo*, no presente estudo foi realizado um protocolo de curto prazo, empregando subdoses dos fármacos no tratamento das infecções causadas por cepas do parasito que apresentam diferentes perfis de susceptibilidade ao benznidazol. Após a finalização dos tratamentos, administrados por apenas 5 dias, os animais foram eutanasiados após outros 5 dias; esse protocolo foi estabelecido de forma a permitir observar os eventos iniciais da “reativação” do parasitismo quando é retirada a pressão dos fármacos, resguardadas as características farmacocinéticas das drogas e a biologia das cepas. De forma interessante, no que diz respeito ao efeito anti-parasitário, essa estratégia nos permitiu visualizar, em curto espaço de tempo, a ausência de efeito da amiodarona em monoterapia, independentemente da linhagem de camundongo ou cepa do parasito; a interação positiva entre o azólico e antiarrítmico sobre a cepa Y, já demonstrada na literatura com a utilização de outros fármacos da mesma classe em avaliações de longa duração (BENAIM *et al.*, 2006; MADIGAN *et al.*, 2019); e a resposta diferencial ao tratamento etiológico pode ser alterada de acordo com a linhagem do roedor. Acreditamos que esse protocolo é adequado para triagem inicial de combinações de fármacos, de forma a utilizar um menor número de animais e tempo de avaliação

reduzido. Ainda, dada a precocidade da eutanásia (15 a 20 dpi, a depender da cepa), a utilização dessa estratégia foi possível avaliar o impacto dos tratamentos no desenvolvimento do processo inflamatório tecidual.

Embora os antifúngicos azólicos e a amiodarona disponham de diversos estudos pré-clínicos, os dados sobre o impacto dessas moléculas em interferir nas lesões teciduais dos hospedeiros infectados por *T. cruzi* é limitado (ADESSE *et al.*, 2010; CASTILHO, 2016). Nossos resultados mostraram que a utilização da amiodarona apesar de não levar à redução da parasitemia, reduziu a celularidade miocárdica comparativamente aos animais infectados pela cepa Y e não tratados, sugerindo um efeito protetor da droga. No entanto, diversos focos de inflamação, com áreas de necrose e conjuntivização foram observados. Adicionalmente, o ravuconazol em subdose, mesmo tendo efeito em reduzir a parasitemia (e o número de ninhos de amastigotas no miocárdio) não preveniu a inflamação e degeneração celular nos BALB/c, enquanto reduziu a celularidade nos *Swiss*, apesar de, assim como observado para a amiodarona, não preveniu a ocorrência de áreas de necrose e conjuntivização. De forma interessante, a administração combinada dos fármacos, suprimiu o parasitismo e preveniu as lesões acima mencionadas, tanto nos *Swiss* quanto nos BALB/c (Figuras 12-13).

Por outro lado, a amiodarona não interferiu no número de núcleos ou áreas de lesão nos animais BALB/c infectados pela cepa Colombiana. Já o ravuconazol, de forma inesperada, foi altamente eficaz em reduzir os níveis parasitêmicos nos animais infectados por essa cepa, que é sabidamente resistente a derivados azólicos (DINIZ *et al.*, 2013; 2018). Esse fato pode ser considerado uma limitação em nosso estudo, visto que prejudicou a visualização do efeito da combinação. Adicionalmente, considerando a biologia dessa cepa - com predomínio de formas largas, período pré-patente longo e mortalidade tardia, um maior tempo de acompanhamento seria necessário para observar com clareza se o tratamento combinado induziu benefício adicional, como sugerido pela curva de parasitemia (Figura 14). Ainda, foi utilizada somente a linhagem BALB/c, escolhida devido à maior estringência observada nos experimentos com a cepa Y. De qualquer forma, os dados obtidos com a utilização dessa cepa altamente resistente, particularmente a sensibilidade à subdose de ravuconazol, incitam a discussão sobre os mecanismos de resistência do parasito ao tratamento etiológico.

A quantificação de citocinas da resposta Th1, Th2 e Th17, bem como determinação dos perfis de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* que serão realizadas em breve no soro de todos os animais, no último dia de tratamento e no dia da eutanásia, etapa que ainda está sendo finalizada, contribuirão para a mais ampla interpretação dos dados relacionados ao comportamento diferenciado das linhagens e cepas do parasito. Adicionalmente, a quantificação do parasitismo no intestino e músculo esquelético por qPCR poderá elucidar se há intensidade e distribuição tecidual distinta do parasitismo em resposta aos diferentes tratamentos. De qualquer forma, os dados gerados neste estudo até o momento sugerem que a linhagem BALB/c é mais adequada para a realização dos experimentos de quimioterapia experimental, por permitir separação mais clara acerca dos diferentes grupos experimentais, além de constituir um modelo experimental mais estrigente.

Por fim, é importante salientar que nos últimos anos, principalmente em função das falhas terapêuticas observadas nos estudos clínicos, tem sido sugerido que os antifúngicos azólicos não constituem alternativas promissoras no tratamento da doença de Chagas (FIELD *et al.*, 2017; AVERY e SYKES, 2018). De fato, o estabelecimento de modelos experimentais capazes de monitorar o progresso da infecção de forma sensível e continuada (FRANCISCO *et al.*, 2015), forneceu evidências que colaboram no entendimento das limitações relacionadas ao estudo desses compostos e que colaboram para a falha terapêutica observada. Porém, acreditamos que devido à (i) alta atividade anti-*T. cruzi* intrínseca desses compostos; (ii) a escassez de novas moléculas com atividade anti-*T. cruzi* comparável e (iii) as limitações nos estudos clínicos que avaliaram os derivados azólicos no tratamento da doença crônica, o potencial terapêutico dos derivados azólicos deve ser explorado em estudos estridentes, especialmente em associação a outros fármacos.

8 CONCLUSÃO

Os resultados nos permitem concluir que:

- A natureza da combinação de ravuconazol e amiodarona sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y é aditiva, na ausência de toxicidade adicional para a células hospedeiras;
- A estratégia experimental utilizada é adequada para *screening* de combinações de fármacos na infecção experimental da doença de Chagas;
- Camundongos BALB/c constituem um modelo mais estrigente para avaliação de novas estratégias terapêuticas para a doença de Chagas;
- A amiodarona potencializa o efeito do ravuconazol na redução do parasitismo e das lesões cardíacas observadas na fase aguda da infecção pela cepa Y de *T.cruzi*;
- A combinação não aumentou o potencial do ravuconazol em reduzir a parasitemia da cepa Colombiana, mas interferiu positivamente em amenizar as lesões cardíacas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESSE, D. *et al.* Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 55, n. 1, p. 203–210, 2010.
- ANDRADE, S. G. *et al.* Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, GB: Carfax Publishing, v. 79, n. 4, p. 397–407, 1985.
- ARGOLO, A. M. *et al.* Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. **Imperial novo milênio**, n. May, p. 63, 2008.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. DE F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–1237, 2014.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, 2013.
- BELLERA, C. L. *et al.* Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: Discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, US: American Chemical Society, v. 53, n. 9, p. 2402–2408, 2013.
- BENAIM, G. *et al.* Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, US: American Chemical Society, v. 49, n. 3, p. 892–899, 2006.
- BENAIM, G. *et al.* *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 56, n. 7, p. 3720–3725, 2012.
- BENAIM, G.; PANIZ MONDOLFI, A. E. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 605–609, 2012.
- BENDITA, C.; BRIEFING, S. **The BENDITA study: A Phase II study to assess safety, tolerability, and efficacy of different benznidazole regimens, alone and in combination with fosravuconazole.** [s.l: s.n.].
- BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. **Cardiology Clinics**, Philadelphia, Pa., US: W.B. Saunders, v. 35, n. 1, p. 31–47, 2017.
- BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, Mass., US: Massachusetts Medical Society, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, Mass., US: Massachusetts Medical Society, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

- BŁYSZCZUK, P. Myocarditis in Humans and in Experimental Animal Models. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. May, p. 1–17, 2019.
- BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and pathogenesis of rheumatic heart disease. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, India, IN: Indian Association of Pathologists and Microbiologists, v. 50, n. 4, p. 685–697, 2019.
- BOSCARDIN, S. B. *et al.* Chagas' disease: An update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6 B, p. 1373–1384, 2010.
- BUSTAMANTE, J. M. *et al.* New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, Ill., US: University of Chicago Press, v. 209, n. 1, p. 150–162, 2014.
- CALDAS, I. S. *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Research**, Berlin, DE: Springer International, v. 103, n. 2, p. 413–421, 2008a.
- CALDAS, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 118, n. 3, p. 315–323, 2008b.
- CAMANDAROBA, E. L. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, MG: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, n. 2, p. 201–209, 2003.
- CARMO, A. A. L. *et al.* Amiodarone and *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with Chagas disease. **Elsevier Science B.V.**, v. 25, n. 3, p. 289–313, 2015.
- CASTILHO, A. DE. **EFEITOS DA AMIODARONA NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO PRÓ-REITORIA, 2016.
- CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1909. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008>
- CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.
- CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in chagas disease drug development: A review. **Drug Design, Development and Therapy**, Chur, Suíça, CH: Harwood Academic Publishers, v. 9, p. 4807–4823, 2015.
- CHENG, F.; KOVÁCS, I. A.; BARABÁSI, A. L. Network-based prediction of drug combinations. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- CLARK-LEWIS, I. *et al.* Structure-activity relationships of chemokines. **Journal of**

Leukocyte Biology. New York, US: Alan R. Liss, v. 57, n. 5, p. 703–711, 1995.

COSTA, F. C. *et al.* Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid *in vivo* localisation and phenotyping. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2018.

COURA, J. R. *et al.* Control of Chagas disease. **World Health Organization - Technical Report Series**, Geneva, Suíça, CH: World Health Organization, n. 905, p. 1–99, 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 102 Suppl, n. August, p. 113–122, 2007.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 104, n. i, p. 31–40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 107, n. March, p. 145–154, 2012.

COURCHESNE, W. E. Characterization of a Novel, Broad-Based Fungicidal Activity for the Antiarrhythmic Drug Amiodarone. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, Md., US: Williams & Wilkins, v. 300, n. 1, p. 195–199, 2002.

COURCHESNE, W. E.; OZTURK, S. Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Salem, Mass., US: Blackwell Scientific Publications, v. 47, n. 1, p. 223–234, 2003.

CRUZ, J. S. *et al.* Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- β . **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 27, n. 2, p. 81–91, 2017.

DE ANDRADE, A L. *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, Minneapolis, Minn., US: Lancet Publications, v. 348, n. 9039, p. 1407–13, 1996.

DE CASTRO, S. L.; SANTA-RITA, R. M.; EINICKER-LAMAS, M. **Quimioterapia Experimental**. [s.l: s.n.].

CASTRO, L. F. D, *et al.* Outcome of E1224-Benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant *trypanosoma cruzi* strain in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 62, n. 6, 2018.

DE LANA, M. *et al.* Clinical and laboratory status of patients with chronic chagas

disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 104, n. 8, p. 1139–1147, 2009.

DIAS, J. C. PINTO *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**, Weinheim, Alemanha, DE: Verlag Chemie, v. 37, n. Suppl 1, p. S34–S45, 2007.

DINIZ, L. D. F. *et al.* Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 54, n. 7, p. 2979–2986, 2010.

DINIZ, L. DE F. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, Irlanda, IE: Elsevier Scientific Publishers Ireland, v. 73, n. 1, p. 1–27, 1990.

DOS SANTOS, F. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 120, n. 4, p. 385–390, 2008.

EHRCHEN, J. *et al.* Senescent BALB/c mice are able to develop resistance to *Leishmania major* infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5106–5114, 2004.

FABBRO, D. L. *et al.* Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: Parasitological, serological and clinical evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2007.

FERREIRA, B. L. *et al.* BALB / c and C57BL / 6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. March, p. 1–12, 2018.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, GB: Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FIELD, M. C. *et al.* Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, London, GB: Nature Publishing Group, v. 15, n. 4, p. 217–231, 2017.

FLORES-FERRER, A. *et al.* Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we

know and what do we need? **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 4, p. 470–487, 2018.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infections revealed by highly sensitive *in vivo* imaging. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 59, n. 8, p. 4653–4661, 2015.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. **Parasitology**, Cambridge, Inglaterra, GB: Cambridge University Press, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, 2017.

FÜGI, M. A. *et al.* Match-making for posaconazole through systems thinking. **Trends in Parasitology**, Oxford, Inglaterra, GB: Elsevier Science, v. 31, n. 2, p. 46–51, 2014.

GARG, J. *et al.* Amiodarone induced pulmonary toxicity: An unusual response to steroids. **American Journal of Case Reports**, v. 13, p. 62–65, 2012.

GOLLOB, W. O. D. AND K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Institutes health of national**, v. 40, n. 6, p. 1301–1315, 2008.

GUPTA, S. SEN *et al.* Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md., US: American Society of Biological Chemists, v. 278, n. 31, p. 28831–28839, 2003.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md., US: American Society of Biological Chemists, v. 286, n. 15, p. 13088–13095, 2011.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB: Oxford University Press, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 2012.

KIMES, B. W.; BRANDT, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Experimental Cell Research**, New York, US: Academic Press, v. 98, n. 2, p. 367–381, 1976.

LANA, DE M. **Experimental studies of Chagas disease in animal models**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LEÓN, C. M. *et al.* Murine models susceptibility to distinct *Trypanosoma cruzi* i genotypes infection. **Parasitology**, Cambridge, Inglaterra, GB: Cambridge University Press, v. 144, n. 4, p. 512–519, 2017.

LEWIS, M. D. *et al.* A new experimental model for assessing drug efficacy against *trypanosoma cruzi* infection based on highly sensitive *in vivo* imaging. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 36–43, 2015.

LÓPEZ-MUÑOZ, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 124, n. 2, p. 167–171, 2010.

LOUCH, W. E.; SHEEHAN, K. A.; WOLSKA, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, GB: Academic Press, v. 51, n. 3, p. 288–298, 2011.

LOURENÇO, A. M. *et al.* Evaluation of *in vitro* anti-*trypanosoma cruzi* activity of medications benznidazole, amiodarone hydrochloride, and their combination. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 51, n. 1, p. 52–56, 2018.

MADIGAN, R. *et al.* Investigation of a combination of amiodarone and itraconazole for treatment of American trypanosomiasis (Chagas disease) in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, Ill., US: American Veterinary Medical Association, v. 255, n. 3, 2019.

MAYA, J. D. *et al.* Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, NL: Elsevier Biomedical Press, v. 86, n. 1, p. 101–106, 1997.

MAZZETI, A. L. *et al.* Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: A pre-clinical study. **Biochemical Pharmacology**, New York, US: Pergamon Press, v. 148, p. 213–221, 2018.

MAZZETI, A. L. *et al.* Synergic effect of allopurinol in combination with nitroheterocyclic compounds against *trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 63, n. 6, p. 1–11, 2019.

MOLINA, I. *et al.* Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, Mass., US: Massachusetts Medical Society, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MORAES, C. B. *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, Tokyo, JP: University of Tokyo, v. 4, p. 1–11, 2014.

MORAES, K. C. M.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 110, n. 2, p. 181–191, 2015.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, US: Elsevier Science Publishers, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MOROCOIMA, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* III from armadillos (*Dasyus novemcinctus novemcinctus*) from Northeastern Venezuela and its biological behavior in murine model. Risk of emergency of Chagas' disease. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 132, n. 3, p. 341–347, 2012.

MÜLLER KRATZ, J. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for

treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.

MURTA, S. M. F. *et al.* In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. **Parasite Immunology**, Oxford, Inglaterra, GB: Blackwell Scientific Publications, v. 21, n. 10, p. 535–544, 1999.

NACCA, N. *et al.* Case Report Severe amiodarone induced pulmonary toxicity. **Journal of Thoracic Disease**, n. 1, p. 5–8, 2012.

OLIVEIRA, M. DE F. *et al.* Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas No Brasil. **Revpatotrop**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.

OYAMA, N. *et al.* Detection of Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity in Supine and Prone Positions. **Circulation Journal**, Kyoto, Japão, JP: Japanese Circulation Society, v. 69, n. 4, p. 466–470, 2005.

PANIZ-MONDOLFI, A. E. *et al.* Amiodarone and itraconazole: A rational therapeutic approach for the treatment of chronic chagas' disease. **Chemotherapy**, Basel, Suíça, CH: S. Karger, v. 55, n. 4, p. 228–233, 2009.

PETERSON, J. K. *et al.* Broad patterns in domestic vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics: synanthropic animals and vector control Quantitative analysis of strategies to achieve the 2020 goals for neglected tropical diseases: where are we now? **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015.

PETRAVICIUS, P. O. *et al.* Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. **Acta Tropica**, Basel, Suíça, CH: Schwabe, v. 200, n. April, p. 105161, 2019.

PINTO-MARTINEZ, A. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* action of a new benzofuran derivative based on amiodarone structure. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 189, p. 8–15, 2018.

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, 2014.

RASSI, A. *et al.* Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, London, GB: British Medical Journal Publishing, v. 95, n. 7, p. 524–534, 2008.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, Minneapolis, Minn., US: Lancet Publications, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

ROGGERO, E. *et al.* Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, Inglaterra, GB: Blackwell Scientific Publications, v. 128, n. 3, p. 421–428, 2002.

ROMANHA, A. J. *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening

and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 105, n. March, p. 233–238, 2010.

ROTH, F. C. *et al.* Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, Irlanda, IE: Elsevier Scientific Publishers Ireland, v. 204, n. 3, p. 135–139, 2013.

SANCHEZ-VALDEZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, p. 1–20, 2018.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F.; PADILLA, A. In situ detection of dormant *trypanosoma cruzi* amastigotes using bioluminescent-fluorescent reporters. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, NJ, US: Humana Press, v. 1955, p. 179–186, 2019.

SCARIM, C. B. *et al.* Response to different benzimidazole doses in animal models of chronic phase chagas disease: A critical review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 51, n. 2, p. 133–140, 2018.

SILVA, I. DE L. M. F. E T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil : um fato histórico Transmission elimination of Chagas ' disease by *Triatoma infestans* in Brazil : an historical fact. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 5, p. 507–509, 2006.

SIMÕES-SILVA, M. R. *et al.* Repurposing strategies for Chagas disease therapy: The effect of imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, Cambridge, Inglaterra, GB: Cambridge University Press, v. 146, n. 8, p. 1006–1012, 2019.

SINGH, B. N. Amiodarone: Historical development and pharmacologic profile. **American Heart Journal**, Saint Louis, Mo., US: American Heart Association, v. 106, n. 4 PART 2, p. 788–797, 1983.

SOUSA, M. A. DE; ALENCAR, A. A. **On the tissular parasitism os *trypanosoma cruzi* Y strain in swiss mice**, 1984.

STEIN, C. *et al.* Amiodarone for arrhythmia in patients with Chagas disease: A systematic review and individual patient data meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1–14, 2018.

STRAUSS, M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* drug combination for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection: A multivariate approach. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 189, p. 19–27, 2018.

SUN, W.; SANDERSON, P.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Institutes health of national**, v. 21, n. 7, p. 1189–1195, 2016.

TAN, X. *et al.* Doxorubicin induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes: role of overexpressed eukaryotic translation initiation factor 5A. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, JP: Pharmaceutical Society of Japan, v. 33, n. 10, p. 1666–1672, 2010.

- TAYLOR, M. C. *et al.* Exploiting genetically modified dual-reporter strains to monitor experimental *trypanosoma cruzi* infections and host-parasite interactions. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, NJ, US: Humana Press, v. 1955, p. 147–163, 2019.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal for parasitology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.
- TORRICO, F. *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, Minneapolis, Minn., US: Lancet Publications, v. 18, n. 4, p. 419–430, 2018.
- TRISCHMANN, T. M. *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 62, n. 2, p. 194–201, 1986.
- TURRENS, J. F. *et al.* Reductase By Benznidazole and Anthelmintic Imidazole Derivatives. **Elsevier Science B.V.**, v. 82, p. 125–129, 1996.
- URBINA, J. A. *et al.* Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrob Agents Chemother.** Bethesda, Md., US, v. 42, n. 7, p. 1771–1777, 1998.
- URBINA, J. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **Int J Antimicrob Agents**, v. 21, n. 1, p. 27–38, 2003.
- URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 311–318, 2009.
- URBINA, J. A. *et al.* Drug Susceptibility of Genetically Engineered *Trypanosoma cruzi* Strains and Sterile Cure in Animal Models as a Criterion for Potential Clinical Efficacy of Anti- *T. cruzi* Drugs. v. 59, n. 12, p. 7923–7924, 2015.
- URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, Kan., US: Society of Protozoologists, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, Oxford, Inglaterra, GB: Elsevier Science, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.
- VASSALLO, P.; TROHMAN, R. G. Prescribing Amiodarone. **Jama**, Chicago, Ill., US: American Medical Association, v. 298, n. 11, p. 1312, 2007.
- VEIGA-SANTOS, P. *et al.* Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 61–71, 2012.
- VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease

with Benznidazole versus no treatment. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, Pa., US: American College of Physicians, v. 144, n. 10, p. 724–734, 2006.

WATKINS, S. J.; BORTHWICK, G. M.; ARTHUR, H. M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 2, p. 125–131, 2011.

WITEK, P. *et al.* The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2407–2415, 2016.

ZINGALES, B. *et al.* Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 159–164, 1999.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.

ZIPES, D.; LIBBY, P.; BRAUNWALD'S, E. . **Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**. 7^o ed. Philadelphia, PA: [s.n.].

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial terapêutico do ravuconazol combinado à amiodarona em diferentes modelos pré-clínicos de infecção aguda murina por *Trypanosoma cruzi*", registrada com o nº 04/2019, sob a responsabilidade de Lívia de Figueiredo Diniz Castro, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | De 30/04/2019 a 01/02/2020 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo BALB/c / isogênico Camundongo Swiss / heterogênico |
| Nº de animais | 91 - Camundongos BALB/c 91 - Camundongo Swiss |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério Central da UNIFAL |

Alfenas, 30 de Abril de 2019



Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG