

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

YARA ALMEIDA MACHADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RAVUCONAZOL EM
COMBINAÇÃO COM ANLÓDIPINO NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi***

ALFENAS/MG

2018

YARA ALMEIDA MACHADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RAVUCONAZOL EM
COMBINAÇÃO COM ANLÓDIPINO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.
Orientadora: Lívia de Figueiredo Diniz Castro

ALFENAS/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Machado, Yara Almeida.
M149a Avaliação dos efeitos do tratamento com ravuconazol em combinação com o anlodipino na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. / Yara Almeida Machado – Alfenas/MG 2018.
79 f.: il. --
Orientadora: Lívia de Figueiredo Diniz Castro.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Sinergismo de Fármacos. 3. Reposicionamento de Medicamentos. I. Castro, Yara Almeida. II. Título.

CDD-615.1



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



YARA ALMEIDA MACHADO

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM RAVUCONAZOL EM
COMBINAÇÃO COM O ANLÓDIPINO NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
POR *Trypanosoma cruzi*”

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: 26 de julho de 2018.

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Livia de Figueiredo Diniz Castro

Profa. Dra. Thaís Viana Fialho Martins

Instituição: UNIFENAS

Assinatura: Thaís Viana Fialho Martins

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Marcos José Marques

Dedico esse trabalho a todos os portadores da Doença de Chagas espalhados pelo mundo que sofrem de suas consequências. E embora esse trabalho não tenha impacto direto sobre seus sofrimentos, espero que minha dedicação deixe uma pequena parcela de contribuição para futuras pesquisas na solução desta doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, por tudo que sou e por tudo que tenho além de tornar tudo possível.

À Professora Livia de Figueiredo Diniz Castro, exemplo de pesquisadora e mulher, que me acolheu e acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava. Que me fez redescobrir o amor pela pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos, confiança, compreensão, paciência e carinho. Tudo isto foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo desta caminhada. Obrigada por ter me ensinada que nem tudo na vida é “só história triste”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que sempre esteve a disposição para auxiliar e ouvir os alunos, em especial aos professores Luiz Felipe e Livia Máris, enquanto nos cargos de coordenação, que confiaram e me instruíram em um dos momentos mais difíceis durante essa caminhada.

Aos demais professores do Programa Ivo Caldas, Fábio Colombo, Marcos Marques, sempre pacientes e dispostos em ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia de Parasitologia (Unifal-MG): técnicos Matheus e Maria Ângela pelo auxílio com materiais e técnicas.

Agradeço de forma especial aos colegas de laboratório, Diego, Elda, Carol e Breno que me ajudaram tanto com palavras de apoio quanto nos experimentos, até mesmo nos finais de semana.

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas por subsidiar minha formação de Mestrado, à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro do projeto, ao Centro de Pesquisa Rene Rachou Fiocruz pela parceria.

Agradeço todos os meus amigos que me apoiaram, me escutaram, me deram forças, me incentivaram e entenderam as minhas ausências. Mas agradeço em especial aos meus irmãos que a vida me permitiu escolher Livia Mara e Pablo Chagas, que estiveram do meu lado todos os dias desses dois anos e sentiram comigo todas minhas angústias e felicidades. Sou muito grata por cada um dos amigos que a vida me colocou no caminho, eu amo vocês. “Quem tem amigos, tem tudo.”

Agradeço por fim, aos mais importantes, minha família, e principalmente minha mãe Luciana, que sempre fez papel de pai e mãe, e que sem ela eu nada seria. Agradeço por ter me apoiado durante a vida em todas as minhas decisões, por mais malucas que foram. Agradeço também, à minha irmã Nádia por ser um ponto de luz na nossa família e sempre me trazer a calma e sensatez. Eu amo vocês.

MACHADO, Yara Almeida. Avaliação dos efeitos do tratamento com ravuconazol em combinação com anlodipino na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 8 milhões de indivíduos. Não há tratamento etiológico eficaz e seguro para a fase crônica da infecção, o que motiva a busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, a combinação de fármacos é uma estratégia promissora, principalmente quando utiliza fármacos já aprovados para uso clínico. O ravuconazol (Ravu) é um antifúngico que apresenta atividade anti-*T. cruzi* bem estabelecida *in vitro* e *in vivo*, no entanto não é eficaz em induzir cura parasitológica quando usado em monoterapia. O anlodipino (Anlo) é um bloqueador de canais de cálcio amplamente utilizado na clínica como anti-hipertensivo e estudos anteriores demonstraram sua atividade tripanossomicida. No presente estudo foram avaliados os efeitos de combinações de Ravu e Anlo na infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi*. Inicialmente foram realizados estudos *in vitro* para investigar o potencial citotóxico da combinação para as células hospedeiras e identificar a natureza da interação entre os fármacos sobre diferentes formas evolutivas do parasito. Para as avaliações *in vivo*, camundongos Swiss experimentalmente infectados ou não foram tratados por via oral durante 20 dias consecutivos com subdoses de ravuconazol (2,5 e 5 mg/Kg) isoladamente e em associação com 10 mg/Kg de anlodipino. A resposta ao tratamento foi avaliada considerando os parâmetros: supressão e reativação da parasitemia, mortalidade e detecção do DNA do parasito, por PCR, em amostras de sangue aos 60 dias após o tratamento. Ainda, foi avaliada a influência dos tratamentos nos perfis de citocinas e resposta humoral dos animais. Os resultados mostraram que não houve toxicidade adicional resultante da utilização combinada dos fármacos *in vitro* e o perfil de interação entre Ravu e Anlo foi dependente da forma evolutiva do parasito utilizada, sendo antagônica sobre formas tripomastigotas e sinérgica quando consideradas as amastigotas intracelulares. Os estudos em modelo murino mostraram que a administração da associação foi bem tolerada na ausência e presença da infecção. Altos níveis de parasitemia e 50% de mortalidade foram detectados nos camundongos infectados e não tratados. A administração de Ravu, em monoterapia ou combinado, induziu redução do parasitismo, sendo observada supressão da parasitemia durante todo o tratamento, protegendo os animais da mortalidade. Já o Anlo quando usado de forma isolada foi eficaz em reduzir o número de formas tripomastigotas detectadas no pico de parasitemia, mas não reduziu a mortalidade. De forma interessante, os tratamentos combinados foram eficazes em aumentar de duas a quatro vezes os índices de cura quando comparados às monoterapias com Ravu, evidenciando uma interação positiva entre fármacos *in vivo*. A análise dos níveis plasmáticos de IgG anti-*T. cruzi* confirmou os achados da avaliação parasitológica, com redução drástica da quantidade de anticorpos até 60 dias após o tratamento. Ainda, o perfil de citocinas identificado em amostras de soro dos animais infectados e tratados com a combinação foi semelhante ao identificado para os camundongos saudáveis. Os resultados permitem concluir que há efeito benéfico resultante da combinação de Ravu com Anlo no tratamento da infecção experimental aguda pela cepa Y de *T. cruzi*.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Combinação de fármacos. Reposicionamento.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects about 8 million individuals. There is no effective and safe treatment for the chronic phase of the infection, which motivates the search for new therapeutic alternatives. In this way, drug combination is a promising strategy, especially when using drugs already approved for clinical use. Ravu is an antifungal that has potent trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo*, however it is not effective in inducing parasitological cure in monotherapy. Amlodipine (Anlo) is a calcium channel blocker widely used as antihypertensive and previous studies have demonstrated its trypanosomicidal activity. In the present study, the effects of Ravu and Anlo combinations on experimental *T. cruzi* infection by Y strain were evaluated. Initially, *in vitro* studies were conducted to investigate the cytotoxic potential of the combinations for mammals cells and to identify the nature of the interaction between the drugs on different forms of the parasite. For *in vivo* evaluations, Swiss mice, experimentally infected or not were treated p.o. for 20 consecutive days with suboptimal doses of ravuconazole (2.5 and 5 mg / kg) alone and in combination with 10 mg / kg amlodipine. The response to treatment was evaluated considering the following parameters: parasitemia suppression and reactivation, mortality and detection of parasite DNA at 60 days after treatment. Also, the influence of the treatments on the cytokine profiles and humoral response were evaluated. The results showed that there was no additional toxicity resulting from the combined use of the drugs *in vitro* and the interaction profile between Ravu and Anlo was dependent of the parasite stage, being antagonistic on trypomastigote forms and synergistic when considering intracellular amastigotes. Murine model studies showed that drug combinations were well tolerated in the absence or presence of the infection. High levels of parasitemia and a 50% mortality rate were detected in infected and untreated mice. The Ravu administration, alone or in combination, induced a drastic reduction in parasitism, with suppression of parasitemia during all the treatment period, protecting the animals from mortality. Anlo when used alone was effective in reducing the number of trypomastigote forms detected at the peak of parasitemia, but did not reduce mortality. Interestingly, the combination treatments were effective in increasing cure rates two to four times when compared to Ravu monotherapies, evidencing a positive interaction between the drugs *in vivo*. Anti-*T. cruzi* IgG plasma levels confirmed these findings, with a drastic reduction in the amount of antibodies up to 60 days after treatment. In addition, the cytokine profile from infected and treated animals was similar to that identified for healthy mice. The results allow concluding that there is a beneficial effect resulting from the combination of Ravu with Anlo in the treatment of acute experimental infection by *T. cruzi* Y strain.

Keywords: Chagas' disease. Drug combination. Repositioning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Efeito do ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapias ou combinação sobre viabilidade das células H9c2.....	41
Figura 2 -	Atividade dos fármacos sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	42
Figura 3 -	Atividade das combinações de ravuconazol e anlodipino sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	43
Figura 4 -	Atividade dos fármacos sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	44
Figura 5 -	Atividade do Ravu e do Anlo em monoterapias e combinação sob as formas amastigotas, baseada no índice endocítico.....	45
Figura 6 -	Células H9c2 infectadas pelas formas amastigotas do <i>T. cruzi</i>	46
Figura 7 -	Efeito dos tratamentos com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou combinação no ganho de peso dos animais.....	47
Figura 8 -	Curva de parasitemia dos camundongos infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> na presença ou ausência de tratamento.....	48
Figura 9 -	Efeito no peso dos grupos de animais tratados com ravuconazol (Ravu), anlopipino (Anlo) em monoteria ou em combinação e do benznidazol (Bz) e no grupo controle positivo.....	49
Figura 10 -	Área sob a curva do número médio de tripomastigostas/ 0,1 ml de sangue x 10 ³ após o tratamento com benznidazol (Bz), ravuconazol (Ravu) e anlopipino (Anlo) em monoteria ou em combinação.....	51

Figura 11 - Avaliação dos níveis de anticorpos da classe IgG total dos animais infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou em combinação, com o benznidazol (Bz), do grupo controle positivo (C+) e controle não infectado (CNI); 30 e 60 dias após o tratamento.....	53
Figura 12 - Efeito dos tratamentos com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou combinação na resposta imune celular dos animais infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> 30 dias após o tratamento.....	54
Figura 13 - Efeito dos tratamentos com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou combinação na resposta imune celular dos animais infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> 60 dias após o tratamento.....	55
Figura 14 - Avaliação do peso do fígado (mg) / peso total (g) dos animais infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou em combinação, com o benznidazol (Bz), do grupo controle positivo (C+) e controle não infectado (CNI); 30 e 60 dias após o tratamento.....	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Método de proporções fixas de ravuconazol e anlodipino utilizadas no experimento de combinação contra as formas tripomastigotas da cepa Y *T. cruzi*..... 33
- Tabela 2 - Influência do tratamento com Ravu e Anlo, em monoterapia ou combinação, sobre a parasitemia e mortalidade de camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*..... 50
- Tabela 3 - Reativação da parasitemia e parâmetros utilizados no controle de cura de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*..... 52

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

% -	Percentual
μg -	Micrograma
μl -	Microlitros
Mm -	Micromolar
Mm -	Micrometros
Σ -	Somatório
A -	Absorbância
Anlo -	Anlodipino
ALT -	Alanina aminotransferas
AST -	Aspartato aminotransferase
ATCC -	American Type Culture Collection
AUS -	rea sob a curva
BMS -	Bristol-Myers Squibb
Bz -	Benznidazol
CBA -	Cytometric beads array
CMC -	Carboxymethylcellulose
CO ₂ -	Dióxido de carbono
CYP51 -	c14 α -demetilase
DEMEM -	Dulbecos Medium
DL-50 -	Concentração da droga que reduz a viabilidade celular em 50%
DNA -	cido desoxirribonucleico
DNDi -	Drugs for Neglected Disease initiative
ELISA -	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FDA -	Food and Drug Administration
FIC -	Fração de concentração inibitória
E1224 -	Pr-droga do ravuconazol
H -	Horas
H ₂ SO ₄ -	cido sulfúrico
H ⁺ -	Cátion Hidrognio
IC-50 -	Concentração inibitória de 50%
IE -	ndice endocítico
IFN- γ -	Interferon gama
IgG -	Imunoglobulina G
IL -	Interleucina
kg -	Kilogramas
Lafepe -	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
Mg -	Miligramas
ml -	Mililitros
Mpk -	Miligramas por kilograma
NaCl -	Cloreto de sdo
Nfx -	Nifurtimox
Nm -	Nanometros
nM -	Nanomolar

OMS -	Organização Mundial de Saúde
OPD -	Orto-fenileno-diamino
Ravu -	Ravuconazol
RNA -	Ácido ribonucléico
ROS	Reactive oxygen species
R0 -	Fator de correção
PCR -	Polimerase Chain Reaction
PBS -	Phosphate-buffered saline
Th -	Lymphocyte T-helper
TNF- α -	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
WHO -	WORLD HEALTH ORGANIZATION

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	A Doença de Chagas	17
2.2	Tratamento etiológico da Doença de Chagas	20
2.3	Busca de novos tratamentos	22
2.3.1	Reposicionamento de drogas.....	22
2.3.1.1	<i>Ravuconazol</i>	23
2.3.1.2	<i>Anlodipino</i>	24
2.3.2	Terapia combinada.....	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Cepas Trypanosoma cruzi	28
4.2	Fármacos e Reagentes	28
4.3	Experimento in vitro	28
4.3.1	Cultivos de células H9c2.....	29
4.3.2	Obtenção do parasito (tripomastigotas de cultura celular)	29
4.3.3	Ensaio de citotoxicidade	29
4.3.4	Avaliação das combinações Ravu/Anlo sobre tripomastigotas e amastigotas intracelulares da cepa Y de T. cruzi in vitro.....	30
4.3.4.1	<i>Determinação do IC-50 do anlodipino e do ravuconazol para as formas amastigotas</i>	31
4.3.4.2	<i>Determinação da natureza da interação entre ravuconazol e anlodipino sobre as formas amastigotas</i>	31
4.3.4.3	<i>Determinação do IC-50 do anlodipino e do ravuconazol para as formas tripomastigotas</i>	32
4.3.4.4	<i>Determinação da natureza da interação entre ravuconazol e anlodipino sobre as formas tripomastigotas</i>	32
4.3.5	Análise estatística dos experimentos in vitro.....	33
4.4	Experimentos in vivo	34
4.4.1	Animais.....	34
4.4.2	Infecção experimental de camundongos pelo T. cruzi.....	34
4.4.3	Esquema de tratamento.....	34
4.4.4	Avaliação da mortalidade e alterações de peso do camundongos.....	35
4.4.5	Métodos utilizados para determinação da eficácia terapêutica.....	35
4.4.5.1	<i>Avaliação da parasitemia</i>	36
4.4.5.2	<i>Extração do DNA e realização da PCR</i>	36
4.4.6	Métodos utilizados para avaliação da influência do tratamento na resposta imune.....	37
4.4.6.1	<i>Avaliação da influência dos tratamentos na resposta imune humoral</i> ...	37
4.4.6.2	<i>Avaliação da influência dos tratamentos na resposta imune celular</i>	38
4.4.7	Análise estatística.....	39

5	RESULTADOS.....	40
6	DISCUSSÕES.....	57
7	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta e descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1911). É uma doença de caráter crônico causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja principal forma de transmissão é a via vetorial. Atualmente, a doença de Chagas ainda é um importante problema médico e social; estima-se que no Brasil 1,5 milhões de pessoas estejam infectadas, a grande maioria na fase crônica da infecção (WHO, 2015).

Devido à ausência de tratamento etiológico eficaz e seguro, cerca de 40% dos indivíduos parasitados apresentam manifestações clínicas decorrentes da fase crônica, como megaesôfago, megacólon e cardiopatia chagásica; em função dessas manifestações, a doença é considerada um dos principais problemas de saúde pública na América Latina (VIOTTI et al., 1994; DIAS; COURA, 1997; MARTINS-MELO et al., 2016). Apenas dois medicamentos podem ser usados no tratamento da doença de Chagas, o benznidazol (Bz) e o nifurtimox (Nfx), sendo o Bz de primeira escolha. Apesar de serem indicados nas fases aguda e crônica, a eficácia da terapia é maior quanto mais cedo o tratamento é iniciado, variando de 60 a 80% nos casos agudas a no máximo 20% para os casos crônicos (TEMPONE et al., 2007). Ainda, ambos os medicamentos induzem efeitos adversos relevantes, os quais levam à suspensão do tratamento em cerca de 30% dos pacientes (COURA; CASTRO, 2002; DIAS et al., 2016; MORILLO et al., 2017).

Devido às limitações dos tratamentos disponíveis, estratégias alternativas no desenvolvimento de terapias para a doença de Chagas têm sido consideradas, além do desenvolvimento de fármacos mais seletivos e eficazes. Nesse sentido, a estratégia de reposicionamento de medicamentos tem sido uma opção atraente, uma vez que os perfis de segurança e farmacológicos desses medicamentos já estão bem caracterizados, permitindo a possibilidade de avançar mais rapidamente para ensaios clínicos (SUN et al., 2016).

Considerando o reposicionamento de fármacos, inibidores da via de biossíntese de ergosterol, desenvolvidos originalmente como antifúngicos, e em particular inibidores da C14-demetilase (CYP51) foram identificados como candidatos para o tratamento da doença de Chagas (URBINA et al., 2003; BUCKNER, 2008). Dentre esses antifúngicos, o posaconazol e o Ravu, por

apresentarem resultados promissores nas avaliações pré-clínicas (URBINA et al., 2003; DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2010), foram avaliados no tratamento da fase crônica assintomática da doença de Chagas. Esse foi um grande avanço, já que desde a introdução do Bz e Nfx, não houve a realização de estudos clínicos desse nível, no entanto, ambos falharam em induzir cura parasitológica (MOLINA et al., 2015; TORRICO et al., 2018). Diante desse cenário, a busca por outras estratégias de tratamento usando esses medicamentos tem sido estimulada (URBINA, 2018; TORRICO et al., 2018).

Outra classe de fármacos que tem se mostrado promissora nos estudos de quimioterapia anti-*T.cruzi* são os bloqueadores de canais de cálcio (REIMÃO et al., 2016), particularmente diidropiridinas, como o anlodipino. Este medicamento, usado na clínica como antihipertensivo, apresenta atividade contra tripanossomatídeos, (HIROTA et al., 2004; REIMÃO et al., 2010). No entanto, sua atividade *in vivo* na infecção por *T.cruzi* não foi ainda apropriadamente estudada. Planer et al. (2014) não identificaram efeito tripanocida do anlodipino durante a fase aguda da infecção murina por *T. cruzi*; já quando esse fármaco foi combinado a um derivado azólico, houve melhora significativa da atividade anti-parasitária. Outros autores demonstraram ainda o benefício, na atividade anti-tripanosomatídeos, do uso combinado de bloqueadores de canais de cálcio a outras classes farmacológicas (NEAL et al., 1989; PLANER et al., 2014).

A terapia de combinação de fármacos que apresentam diferentes mecanismos de ação é uma alternativa que pode contribuir para aumentar a eficácia da estratégia de reposicionamento (DYBUL et al., 2002). Já usada com sucesso no tratamento de diversas doenças, infecciosas ou não, a associação de fármacos tem sido indicada como uma estratégia promissora na quimioterapia da doença de Chagas (URBINA, 2010).

Considerando esses antecedentes, no presente estudo foram estudados os efeitos do tratamento com Ravu quando associado ao Anlo em modelos pré-clínicos de infecção por *T. cruzi*. Foram determinadas a natureza da interação dos fármacos contra o parasito *in vitro*, bem como o perfil de toxicidade e impacto da terapia combinada no parasitismo e resposta imune de camundongos experimentalmente infectados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão do presente estudo está embasada em definições e exemplos, encontrados na literatura, que denotam a importância da descoberta de uma terapia alternativa para doença de Chagas.

2.1 A doença de Chagas

T. cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário digenético que tem como reservatório diversos hospedeiros mamíferos. Em geral, o parasito é transmitido ao homem no momento do repasto sanguíneo de insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros, bicho de frade, bicudo, chupança, chupão, fincão, gauderio, procotó, entre outros (FERREIRA; SILVA, 2006). Esses insetos, ao sugarem sangue, depositam sobre a pele do hospedeiro suas fezes contendo tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, que são formas evolutivas infectantes do parasito (BRENER, 1987; DIAS, 1992).

Observou-se grande diminuição da incidência da doença no Brasil principalmente devido ao combate sistematizado dos principais vetores domiciliares, como *Triatoma infestans* (MONCAYO; SILVEIRA, 2009; COURA; DIAS, 2009; FERREIRA; SILVA, 2006). No entanto, outros mecanismos de transmissão são possíveis: por meio de transfusão de hemoderivados ou transplante de órgãos por doadores contaminados; via congênita; acidentes em laboratórios e via oral (BRENER, 1987; DIAS et al., 1992). Esta última forma de transmissão vem apresentando altos índices entre populações de áreas endêmicas, como Brasil, com grande importância pela sua frequência, dificuldade de controle, falta de reconhecimento e necessidade de novas estratégias de prevenção. A transmissão pela via oral ocorre principalmente por ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou suas fezes, como polpa de açaí e caldo de cana, mas também por ingestão de carne crua ou mal cozida, ou ainda pelas secreções de alguns marsupiais infectados (COURA, 2015; BRASIL, 2015). Entre 2000 a 2013, conforme divulgado pelo Ministério da Saúde, foram registrados 1.570 casos da

doença de Chagas aguda no Brasil; em 68,9% destes casos a transmissão ocorreu por via oral, em 23,7% dos casos a forma de transmissão foi desconhecida, 6,4% por via vetorial, 0,7% por outras formas de transmissão (transfusional ou acidental) e 0,4% por transmissão vertical (BRASIL, 2015). Ainda, a vigilância epidemiológica é um desafio constante, com destaque para a domiciliação de espécies vetoras secundárias (COURA, 2015).

A infecção por *T. cruzi* cursa no hospedeiro vertebrado em duas fases distintas: aguda e crônica, as quais são caracterizadas por aspectos relacionados à biologia do parasito e à resposta do hospedeiro. *T. cruzi* pode parasitar qualquer tipo celular nucleado, e diferentes cepas do parasito apresentam tropismo diferenciado por células musculares, nervosas e do sistema fagocítico mononuclear (ANDRADE, 1987). Uma vez no organismo do hospedeiro, *T. cruzi* conta com uma série de mecanismos de sobrevivência e evasão que garantem o estabelecimento da infecção. Livre no citoplasma ele se diferencia em amastigota, as quais multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas, denominadas sanguíneas, que são liberadas após a ruptura da membrana das células hospedeiras para invadir novas células e/ou alcançar a corrente sanguínea. Uma vez na circulação, o parasito evade da lise mediada pelo complemento e alcança diversos tecidos durante a fase aguda, induzindo a resposta imune humoral e celular (revisto por DIAS et al., 2016).

Na fase aguda, a maioria dos casos é assintomática ou com sinais e sintomas geralmente inespecíficos; essa fase é caracterizada pela presença de tripomastigotas no sangue periférico do hospedeiro e intenso parasitismo tecidual acompanhado de processo inflamatório, devido aos ciclos de multiplicação intracelular das formas amastigotas do parasito (BARRET et al., 2003). Na ausência de tratamento específico, os sintomas podem persistir por até dois meses, com taxa de mortalidade variando de 2-8%, principalmente em crianças. Com o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro, as manifestações da fase aguda regredem e instala-se gradativamente a fase crônica, que pode perdurar por anos ou décadas, na qual a parasitemia e o parasitismo podem permanecer escassos por toda a vida do indivíduo (DIAS, 1992; COURA; CASTRO, 2002). A evolução para a fase crônica pode ser acompanhada pelo comprometimento cardíaco e/ou digestório do indivíduo parasitado, com difícil detecção de parasitos circulantes (BARRET et al., 2003). Nesses casos, pode haver o acometimento cardíaco em cerca de 30% dos pacientes, enquanto o megaesôfago e megacólon acometem cerca de 10%.

Dentre as manifestações da fase crônica, a mais grave é a forma cardíaca, que pode conduzir à morte súbita (DIAS, 1992; OLIVEIRA et al., 2008).

A grande diversidade de manifestações clínicas na fase crônica ainda não pode ser explicada; entretanto fatores como a variabilidade genética e biológica do parasito, bem como a resposta imune do hospedeiro, têm sido sugeridos como fatores determinantes (ANDRADE et al., 1998; ESTANI et al., 1998; DUTRA & GOLLOB, 2008). A falha em eliminar totalmente o parasito do organismo leva a uma atividade prolongada do sistema imune, culminando no aparecimento de lesões teciduais, resultantes de um processo inflamatório crônico e fibrose associada, caracterizando a fase crônica. Assim, as células e mecanismos efetores do sistema imune seriam então responsáveis, tanto pelo controle da multiplicação do parasito nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária (revisto por DIAS et al., 2016)

Em função da morbidade causada pelas manifestações da fase crônica, incluindo a insuficiência cardíaca e os megas digestivos, é gerado um gasto de aproximadamente 6,5 bilhões de dólares/ano para os governos dos países da América Latina (WHO, 2002), sendo considerada uma parasitose negligenciada (HOTEZ et al., 2006; WHO 2017). A alta mortalidade devido a doença de Chagas é uma característica particular desses países, especialmente o Brasil. Um estudo realizado baseado na mortalidade causada pelas doenças tropicais negligenciadas no país, por um período de 12 anos (entre 2000 e 2011) mostrou que do total de 12.491.280 mortes registradas, a tripanossomíase americana foi responsável pelo maior número de óbitos, 58.928 (76,7% de todas as mortes de doenças tropicais negligenciadas), seguida pela esquistossomose 6319 (8,2%) e leishmaniose 3466 (4,5%) (MARTINS-MELO et al., 2016).

Mesmo com grandes esforços para reduzir o impacto da parasitose em diversos países, a exemplo das medidas no controle do vetor, devido a sua natureza crônica e à ausência de tratamento etiológico eficaz, as taxas de mortalidade têm caído devagar (MARTINS-MELO et al., 2012). Adicionalmente, a doença de Chagas não está restrita a países em desenvolvimento e se apresenta como problema emergente de saúde pública, mesmo em países desenvolvidos, principalmente nos Estados Unidos e países europeus. Só recentemente foi reconhecida como problema de saúde pública nesses países, onde a transmissão vetorial não acontece, mas a migração de indivíduos infectados gera outras formas de

contaminação, como a transfusão de sangue, o transplante de órgãos, e a transmissão vertical (GASCON et al., 2010).

2.2 Tratamento etiológico da doença de Chagas

Desde o final dos anos 1960 e início da década de 1970 dois compostos nitro-heterocíclicos estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o Bz (Benznidazol, Lafep; Abarax, ELEA) e Nfx (Lampit®, Bayer). Ambos medicamentos atuam como pró-fármacos que necessitam ser reduzidos por uma nitroredutase do parasito a fim de se tornarem ativos (WILKINSON et al., 2008). Foi descrito que o Bz induz oxidação, principalmente no *pool* de nucleotídeos. Assim a incorporação extensiva de nucleotídeos oxidados durante a replicação do DNA provoca quebras da cadeia dupla do *T. cruzi*, destruindo seu DNA (RAJÃO, et al., 2014). Já o Nfx libera cátions nitroaniônicos e abre cadeias de nitrilas, levando a intoxicação do parasito. Ambos os compostos interagem com uma série de biomoléculas, formando ligações com DNA e grupos tiol e gerando substâncias altamente reativas (HALL et al., 2011).

Dados da literatura mostram que o tratamento etiológico com ambos os medicamentos tem atividade significativa na fase aguda da doença de Chagas, com índices de cura parasitológica de até 80% em pacientes tratados, sendo esta cura definida como um resultado negativo para todos os testes parasitológicos e sorológicos (OLIVEIRA et al., 2008; CANÇADO, 2002). No entanto, sua eficácia varia de acordo com a área geográfica, provavelmente devido as diferenças na susceptibilidade aos medicamentos das diferentes cepas de *T. cruzi* (COURA; DIAS, 2009).

Diversos estudos clínicos publicados mostram a baixa eficácia do tratamento com Bz e Nfx na doença de Chagas crônica, onde as taxas variam de 8% a 19,1% (FERREIRA, 1990; VIOTTI et al., 1994, 2006; FABBRO DE SUASNÁBAR et al., 2000; BRAGA et al., 2000; LAURIA-PIRES et al., 2000; CANÇADO, 2002; LANA et al., 2009). E, por ser uma doença de evolução lenta, na maioria das vezes é diagnosticada quando o indivíduo já se encontra nessa fase. Ainda não foram elucidados os motivos que levam à baixa eficácia dos compostos nitroheterocíclicos

na fase crônica da doença de Chagas, mas eles podem estar relacionados às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, como meia-vida relativamente baixa e limitada penetração nos tecidos (DOCAMPO; URBINA, 2003; BUCKNER, 2008; MORILLO et al., 2017; PERIN et al., 2017). Adicionalmente, a grande variabilidade genética e biológica do parasito são fatores importantes.

Os efeitos colaterais provocados pelo Bz e Nfx induzem a descontinuação do tratamento em 10% a 40% dos indivíduos (COURA; CASTRO, 2002; MARINETO et al., 2009; URBINA, 2015). As reações mais comuns incluem dermatopatia por hipersensibilidade, com eritema polimorfo não bolhoso, pruriginoso, seguindo-se de descamação (geralmente aparecendo entre o 7^o e 10^o dia de tratamento); no entanto, pode ocorrer ainda depressão da medula óssea, com agranulocitose, polineuropatia periférica e até augesia. Além disso, o tratamento com esses medicamentos não deve ser indicado para pacientes com doenças cardíacas graves, doenças respiratórias, hemopatias, insuficiência renal ou hepática e neoplasias. Essas contraindicações inviabilizam o tratamento etiológico de pessoas muito debilitadas, idosos, além de mulheres grávidas (COURA; CASTRO, 2002; DIAS et al., 2016; MORILLO et al., 2017).

O Nfx teve sua comercialização interrompida desde a década de 80, primeiramente no Brasil, seguido pela Argentina, Chile e Uruguai, possivelmente em razão do efeito tripanocida menor em algumas regiões endêmicas, associado à alta incidência de reações adversas (DOCAMPO; MORENO, 1986). Dessa forma, no Brasil, o medicamento de referência no tratamento da parasitose é o Bz. O esquema terapêutico preconizado consiste na dose de 5mg/Kg, divididos em duas doses diárias e deve ser mantido por 30 a 60 dias consecutivos, durante a fase aguda, e por 60 dias durante a fase crônica. Crianças com menos de 40 kg podem receber 7,5mg/kg de peso corporal, durante 60 dias (DIAS et al., 2016). Esse longo tempo de tratamento costuma dificultar a adesão do paciente ao tratamento, especialmente na ocorrência de reações adversas.

Assim, o sucesso da terapêutica é limitado em diversos pontos: baixos índices de cura na fase crônica, esquema terapêutico prolongado e reações adversas importantes, sendo necessária a busca de novos tratamentos.

2.3 Busca de novos tratamentos

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos são processos que demandam altos investimentos e longo tempo de execução, devidos às várias etapas envolvidas desde a concepção de uma nova molécula até a conclusão de estudos clínicos. Novas estratégias têm sido propostas para agilizar esse processo; uma delas é chamada de reposicionamento de fármacos (ASHBURN et al., 2004).

2.3.1 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento de fármacos tem como objetivo principal utilizar fármacos já existentes para tratamento de outras doenças (ASHBURN et al., 2004). Esse processo visa principalmente à redução de custos e aumento da velocidade de desenvolvimento para a validação de um novo medicamento, já que as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas já são bem estabelecidas (CHONG et al., 2007). Portanto, quando um novo uso terapêutico é identificado para um fármaco licenciado, pode-se progredir mais rapidamente para os ensaios clínicos (KAISER et al., 2015). Nos últimos dez anos, houve um avanço significativo relacionado a este tema. O aumento do número de medicamentos aprovados e acessíveis, combinados com os esforços para o reposicionamento de fármacos por meio do governo, indústria e meio acadêmico contribuíram grandemente para o aumento das publicações relacionadas a este tema (SUN et al., 2016).

Frente à problemática da terapêutica das doenças tropicais negligenciadas, incluindo a doença de Chagas, o reposicionamento é uma estratégia especialmente relevante. A triagem de fármacos desenvolvidos para outros propósitos e disponíveis na clínica médica vem se apresentando como uma das abordagens mais promissoras para a introdução de novas terapias anti- *T. cruzi* (KAISER et al., 2015; SBARAGLINI et al., 2016). Alguns dos exemplos mais bem sucedidos são os inibidores de C14- α -demetilase (CYP51) desenvolvidos como agentes anti-fúngicos e avaliados em modelos experimentais de infecção por *T. cruzi*. Diversos

medicamentos dessa classe exibiram potente atividade em modelos *in vitro* e *in vivo*, como o itraconazol e albaconazol (URBINA, 1998; VAN CAUTEREN, et al., 1987; APT et al., 1999; MOREIRA et al, 1991; GUEDES et al., 2004). O posaconazol é outro antifúngico que apresentou a capacidade de induzir a cura parasitológica nos estágios agudos e crônicos da doença de Chagas em estudos pré- clínicos, mas não apresentou a mesma eficácia em estudos clínicos de fase II (revisto por FÜGI et al., 2015). Situação similar foi observada para o E1224, um pró-fármaco do ravuconazol, azólico de administração oral que apresentou excelentes resultados em modelos experimentais, mas falhou em induzir cura na doença humana (URBINA et al., 2003; DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2010; TORRICO et al., 2018), evidenciando a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas usando esses fármacos.

2.3.1.1 Ravuconazol

O Ravu é um derivado triazólico de terceira geração desenvolvido para utilização como antifúngico sistêmico (HATA et al., 1996). É um inibidor da via de biossíntese de esterol, em particular, da enzima C14-demetilase (CYP51), essencial para a sobrevivência do parasito. Uma vez inibida a síntese de ergosterol, o parasito não é capaz de utilizar completamente a oferta de colesterol disponível pelo organismo do hospedeiro (URBINA, 1998, 2009).

A potente atividade supressiva do ravuconazol pode ser observada *in vitro* e *in vivo*, em modelos experimentais murinos e caninos da doença de Chagas aguda; no entanto não foi capaz de curar a infecção. Foi sugerido que esse efeito apenas supressivo seria devido às suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis nesses modelos, já que sua meia-vida nos camundongos é de 4 h e nos cães é de 8,8 h (URBINA et al., 2003; DE FIGUEIREDO DINIZ et al. 2010). A partir desses resultados, foi desenvolvido um pró-fármaco solúvel do ravuconazol, com melhor absorção e biodisponibilidade, o E1224. Um ensaio clínico duplo cego, randomizado de Fase II foi feito na Bolívia para investigar a eficácia e segurança deste pró-fármaco no tratamento de pacientes na fase crônica assintomática, sendo conduzido pela DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*). Os resultados mostraram que houve perfil satisfatório de segurança, mas pouca ou nenhuma eficácia do

tratamento, como monoterapia, em induzir a cura da infecção (TORRICO, et al. 2018). Considerando esses resultados, foi sugerido que novos esquemas de doses, bem como terapias combinadas de ravuconazol a outros medicamentos sejam consideradas.

2.3.1.2 Anlodipino

O Anlo é um fármaco bloqueador de canais de cálcio pertencente à classe das dihidropiridinas; induz uma seletiva inibição do influxo de cálcio através das membranas celulares. É amplamente utilizado na terapia antihipertensiva, espasmos cerebrovasculares, angina e taquirritmia (ALBERNETHY et al., 1999). Ainda em 2003 foi demonstrada a atividade antimicrobiana desse medicamento (KUMAR et al., 2003), posteriormente estudos mostraram o efeito do anlodipino contra protozoários. Foi demonstrada atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e *T. cruzi* (HIROTA et al., 2004; REIMÃO et al., 2010; REIMÃO et al., 2016) e *in vivo* contra uma variedade de espécies de *Leishmania* (PALIT E ALI, 2008; REIMÃO et al., 2016). Seu mecanismo de ação sobre protozoários ainda não foi elucidado, mas em um estudo realizado contra *L. (L.) infantum* os autores observaram que a atividade leishmanicida está relacionada a uma disfunção na mitocôndria e à geração de ROS (Reactive oxygen species). Nesse caso, Palit e Ali (2008) mostraram que a mitocôndria é o principal alvo intracelular do anlodipino contra *L. (L.) donovani*, onde interferência nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial poderia ser aparentemente responsável pelos efeitos letais, devido à redução no consumo de oxigênio, que provoca um aumento de ROS, levando a uma perda de potencial de membrana (SEN et al., 2004) e liberação de citocromo c no citoplasma. Esses eventos seriam responsáveis pela ativação de proteases como as caspases 3 (KROEMER, DALLAPORTA, RESCHE-RIGON, 1998) que desempenham papéis importantes na cascata apoptótica desses parasitos (SEN et al., 2004), culminando na morte por apoptose (PALIT E ALI, 2008).

REIMÃO et al., 2016 demonstraram a capacidade do Anlo em alterar o potencial de membrana mitocondrial e aumentar a geração de ROS em *Leishmania*, o que pode levar à morte do parasito por estresse oxidativo. Sabe-se que a

mitocôndria é umas das maiores fontes de ROS em tripanosomatídeos, desenvolvendo diferentes funções que envolvem sinalização ou citotoxicidade; para controlar os níveis de ROS presentes nas mitocôndrias os parasitos apresentam defesas antioxidantes (MENNA-BARRETO E DE CASTRO, 2014). Diante desses dados promissores, é importante estudar os efeitos do tratamento com esse medicamento na infecção por *T. cruzi*, isoladamente ou em associação a outros fármacos.

2.3.2 Terapia combinada

A combinação de compostos tem sido uma estratégia utilizada com êxito no tratamento de diversas doenças infecciosas, como HIV/SIDA (DYBUL et al., 2012), malária (WHO, 2001), tuberculose (LIENHARDT et al., 2012), entre outras. A combinação de várias classes químicas e diferentes mecanismos de ação pode produzir um efeito sinérgico, resultando na redução do tempo de tratamento e/ou da dose do medicamento, contribuindo para reduzir custos e reações adversas; minimizar o desenvolvimento de resistência; além de aumentar a eficácia do tratamento. Portanto, o uso de combinações de moléculas pode aumentar o sucesso do reposicionamento de fármacos (SUN et al., 2016).

Diversos estudos com combinações de fármacos foram realizados nas últimas décadas, muitos deles explorando o potencial tripanocida de inibidores da síntese de ergosterol (CYP51) e compostos nitro-heterocíclicos, além de outras classes farmacológicas. Usando tratamentos mais curtos e/ou doses sub-ótimas, diversos autores mostraram boa eficácia da terapia combinada em modelos murinos da doença de Chagas (revisto por BAHIA et al., 2014). Algumas combinações, apesar de não induzirem cura parasitológica, interferiram no desenvolvimento das lesões associadas à fase crônica da infecção, o que é de grande importância quando considerada a evolução da doença. Dessa forma, o estudo de terapias combinadas tem sido muito estimulado na área de quimioterapia anti-*T. cruzi*, sejam essas combinações estabelecidas de forma racional ou fenotípica.

Planer et al. (2014) estudaram combinações de diversos medicamentos e compostos biologicamente ativos, pertencentes a diversas classes farmacológicas

e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration). De uma série 24 combinações, duas apresentaram efeito significativo na redução da parasitemia de camundongos na fase aguda da doença de Chagas: posaconazol associado à clemastina e posaconazol associado ao anlodipino. No entanto, não foi avaliada a capacidade dessas combinações em induzir cura parasitológica. Esses estudos sugerem novamente que a utilização do anlodipino pode resultar em efeito positivo no controle da infecção por *T. cruzi*, incentivando assim estudos dessa natureza.

Considerando o contexto de busca de novas estratégias terapêuticas para a doença de Chagas e os dados pré-clínicos e clínicos disponíveis acerca da segurança de utilização dos fármacos Ravu e Anlo, neste trabalho foram avaliados os efeitos da combinação desses fármacos sobre a fase aguda da infecção pela cepa Y de *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

Os objetivos traçados para o presente estudo serão relatados a seguir.

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com ravuconazol em combinação com o anlodipino na infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi*.

3.2 Específicos

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- a) Avaliar, *in vitro*, a natureza da interação entre os fármacos Ravu e Anlo sobre diferentes formas evolutivas da cepa Y de *T. cruzi* e a toxicidade para as células hospedeiras;
- b) Investigar o potencial citotóxico da combinação *in vivo*;
- c) Determinar a influência do tratamento usando combinações de Ravu e Anlo na redução do parasitismo durante a infecção aguda experimental de camundongos pela cepa Y do *T. cruzi*;
- d) Verificar o impacto do tratamento com Ravu e Anlo na resposta imune humoral e celular dos animais infectados pela cepa Y; comparando com os animais não tratados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para cumprimento dos objetivos propostos para este trabalho, foram realizados diferentes ensaios e métodos que serão discutidos em sequência.

4.1 Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*. Essa cepa, descrita em 1953 por Silva; Nussenzweig, é mantida em laboratório por meio de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos. A cepa Y é considerada parcialmente sensível ao benznidazol e ao nifurtimox (FILARDI; BRENER, 1987).

4.2 Fármacos e reagentes

a) Benznidazol (Bz): 2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitro-1-imidazoleacetamide), usado como fármaco de referência (Lefepe, Brasil);

b) Ravuconazol (Ravu): ([R-(R*,R*)]-4-[2-[2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-thiazolyl]benzotrile), (Eisai, Japão);

c) Anlodipino (Anlo): besilato de anlodipino: (RS)-3-ethyl 5-methyl 2--4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), (Bayer, Brasil);

d) Resazurina: sal dissódico, utilizada como indicador da proliferação celular, (Sigma, EUA).

4.3 Experimentos *in vitro*

Para realização dos experimentos *in vitro* foram adotados os seguintes procedimentos:

4.3.1 Cultivos de células H9c2

Células da linhagem H9c2, cardiomiócitos, (*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 et al., 2015).

4.3.2 Obtenção do parasito (tripomastigotas de cultura celular)

As formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células H9c2 previamente infectadas por tripomastigotas sanguíneos obtidos de camundongos no pico de parasitemia. Após 24 horas da incubação das células com os tripomastigotas sanguíneos, o meio de cultura foi removido e os parasitos não internalizados foram retirados através 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 DMEM fresco para utilização.

4.3.3 Ensaio de citotoxicidade

Culturas de células H9c2 não infectadas foram tratadas com concentrações decrescentes dos fármacos por 72 horas e posteriormente a viabilidade celular foi quantificada. Duzentos microlitros de suspensão das células H9c2, na concentração de 1×10^4 /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 concentrações decrescentes de Ravu (a partir de 100 nM) ou Anlo (a partir de 100 µM) isoladamente ou em combinação. Foram avaliadas 7 diluições seriadas na razão de 1:2. Após 48 horas de incubação 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 (DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2013). Decorridas 4 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:

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

Nessa 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). O Índice de Seletividade (IS) foi determinado por meio da seguinte expressão: IC-50 (em células de mamíferos)/ IC-50 (sobre os parasitos na forma amastigota).

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

4.3.4 Avaliação das combinações Ravu/Anlo sobre tripomastigotas e amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi in vitro*

Para avaliar o efeito das combinações de Ravu/Anlo sobre formas tripomastigotas e sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi* utilizaram-se os parâmetros descritos à seguir.

4.3.4.1 *Determinação da IC-50 do anlodipino e do ravuconazol para as formas amastigotas*

Células H9c2, mantidas como descrito no item 5.3.1., foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 1×10^4 células/mL sobre lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas em estufa a 37°, 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 decrescentes dos fármacos, em diluições seriadas 1:2, sendo as concentrações iniciais de 10 µM e 10 nM para Anlo e Ravu, respectivamente. Foram incluídos controles positivos (células infectadas, na ausência de fármacos) e negativos (células e meio). As placas foram novamente incubadas por 72 horas, nas mesmas condições, quando as lamínulas foram removidas, lavadas em PBS, fixadas por 5 minutos em metanol e finalmente coradas pelo Giemsa (10% em água destilada). A determinação do número de células infectadas (contendo amastigotas viáveis) foi feita por meio de leitura em microscópio ótico. A partir dos valores de percentual de infecção nas células submetidas ou não à incubação com as drogas foram calculados os valores de IC-50 para os fármacos. Para esse cálculo foi utilizado o programa *CompuSyn*.

4.3.4.2 *Determinação da natureza da interação entre ravuconazol e anlodipino sobre as formas amastigotas*

Para identificar se há efeito sinérgico, aditivo ou antagônico resultante da combinação Ravu e Anlo sobre as formas amastigotas foi calculado primeiramente o índice endocítico. O índice endocítico considera tanto o percentual de células infectadas quanto a capacidade de proliferação do parasito sob pressão dos fármacos, ou seja, o número de amastigotas por célula. A determinação do número

do número de amastigotas por células foi feita por meio de leitura em microscópio óptico.

4.3.4.3 Determinação da IC-50 do anlodipino e do ravuconazol para as formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas da cepa Y que foram obtidas como descrito no item 4.3.2 foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas, na concentração de 1×10^6 /poço, em placas de 96 poços. Os parasitos foram incubados com concentrações decrescentes dos fármacos, em diluições seriadas 1:2, sendo as concentrações iniciais de 30 μ M e 30 nM para anlodipino e ravuconazol, respectivamente. Foram incluídos controles positivos (parasitos em meio de cultura sem a presença dos fármacos) e controles positivos incubados com DMSO. Após 24 horas em estufa a 37^o, 5% CO₂ os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer. A partir dos valores de percentual de mortalidade dos parasitos incubados ou não com os fármacos foram calculados os valores de IC-50. Para esse cálculo foi utilizado o programa *CompuSyn*. As curvas de dose-efeito foram construídas no *Graphpad Prism*.

4.3.4.4 Determinação da natureza da interação entre ravuconazol e anlodipino sobre as formas tripomastigotas

Para investigar a ocorrência efeito sinérgico, aditivo ou antagônico resultante da combinação Ravu e Anlo sobre as formas tripomastigotas, foi utilizado o método de proporções fixas descrito por Fivelman et al., 2004. Após a identificação dos valores de IC-50 dos fármacos em monoterapia, foram estabelecidas as concentrações para utilização no experimento de combinação, de forma a garantir que o IC-50 de cada fármaco estivesse no ponto médio de uma série de 5 diluições. A partir desses valores, foram feitas misturas nas proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3,

1:4 e 0:5, seguidas das 5 diluições 1:2 de Anlo e Ravu (FIVELMAN et al., 2004) (Tabela 1).

Tabela 1 - Método de proporções fixas de ravuconazol e anlodipino utilizadas no experimento de combinação contra as formas tripomastigotas da cepa Y *T. cruzi*.

Ravuconazol (A) Monoterapia (5A + 0B)	Mistura 1 (4A + 1B)	Mistura 2 (3A + 2B)	Mistura 3 (2A + 3B)	Mistura 4 (1A + 4B)	Anlodipino (B) Monoterapia (0A + 5B)
120 nM A	96 nM A	72 nM A	48 nM A	24 nM A	25 µM B
	+	+	+	+	
60 nM A	5 µM B	10 µM B	15 µM B	20 µM B	12,5 µM B
	48 nM A	36 nM A	24 nM A	12 nM A	
30 nM A	+	+	+	+	6,25 µM B
	2,5 µM B	5 µM B	7,5 µM B	10 µM B	
15 nM A	24 nM A	18 nM A	12 nM A	6 nM A	3,125 µM B
	+	+	+	+	
7,5 nM A	1,25 µM B	2,5 µM B	3,75 µM B	5 µM B	1,562 µM B
	12 nM A	9 nM A	6 nM A	3 nM A	
7,5 nM A	0,625 µM B	1,25 µM B	1,875 µM B	2,5 µM B	1,562 µM B
	6 nM A	4,5 nM A	3 nM A	1,5 nM A	
	+	+	+	+	
	0,312 µM B	0,624 µM B	0,936 µM B	1,248 µM B	

Fonte: Da autora.

Depois de realizadas as diluições das monoterapias e misturas em placa de 96 poços, as formas tripomastigotas da cepa Y que foram obtidas como descrito no item 4.3.2 foram plaqueadas na concentra de 1×10^6 tripomastigotas/poço. Após 24 horas em estufa a 37°, 5% CO₂ os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer. As curvas de dose-efeito foram construídas no *Graphpad Prism*.

4.3.5 Análise estatística dos experimentos *in vitro*

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

4.4 Experimentos *in vivo*

Para realização dos experimentos *in vivo* foi adotado os seguintes procedimentos:

4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, com idade entre 28 a 30 dias, pesando entre 18 e 24 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Alfenas. 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 aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL sob o número 14/2016.

4.4.2 Infecção experimental de camundongos por *T.cruzi*

Camundongos *Swiss* foram infectados, por via intraperitoneal, com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, obtidas por punção do plexo venoso retro-orbital de camundongos infectados, no dia do pico de parasitemia.

4.4.3 Esquemas de tratamento

Os fármacos foram administrados por via oral, em suspensão de CMC (Carboxymethylcellulose) 0,5%, por meio de gavagem. Quando utilizados em combinação, a administração de cada composto foi realizada separadamente, com cerca 30 minutos de intervalo, sendo o Ravu administrado antes do Anlo. O volume total de suspensão administrada foi 0,2 mL.

O tratamento foi iniciado no 5º dia após a infecção, primeiro dia de parasitemia patente. Os animais (n=8/grupo) foram tratados durante 20 dias com uma dose diária de:

- a) Ravuconazol 2,5mg/Kg;
- b) Ravuconazol 5,0mg/Kg;
- c) Anlodipino 10mg/Kg;
- d) Ravuconazol 2,5mg/Kg + Anlodipino 10mg/Kg;
- e) Ravuconazol 5mg/Kg + Anlodipino 10mg/Kg;
- f) Benznidazol 100mg/Kg;

Foram incluídos ainda o grupos-controle: animais infectados e não tratados (n=8); animais não infectados e tratados em monoterapia ou combinação dos fármacos nas maiores doses e não infectados não tratados (n=3/grupo).

4.4.4 Avaliação da mortalidade e alterações de peso dos camundongos

A partir do quinto dia pós-infecção, a mortalidade dos animais foi avaliada diariamente, até 30 dias após o término do tratamento. A avaliação de peso foi realizada semanalmente.

4.4.5 Métodos utilizados para determinação da eficácia terapêutica

A metodologia utilizada para o controle de cura consistiu em exame de sangue a fresco durante e até 30 dias após o tratamento, seguida por ensaio de PCR em tempo real realizado em amostras de sangue dos animais que não apresentaram reativação da parasitemia.

4.4.5.1 Avaliação da parasitemia

O exame de sangue a fresco foi realizado diariamente desde a detecção da parasitemia e até 30 dias após o término do tratamento, a fim de determinar a supressão e/ou a reativação natural 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). Foi considerada supressão da parasitemia a ausência de parasitos, detectados no exame de sangue a fresco, por um período de no mínimo 5 dias consecutivos e mantida até o término do tratamento.

4.4.5.2 Extração do DNA e realização da PCR

A extração de DNA genômico do sangue total dos animais infectados pelo *T. cruzi* e tratados ou não, foi realizada utilizando-se o kit comercial *Wizard® GenomicDNA Purification Kit*, Promega. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A amostra foi de 200 µL de sangue coletado de cada animal, 30 dias pós o tratamento, adicionado de 35µL de anticoagulante (citrato). Além das amostras dos animais tratados, em cada extração foram incluídas uma amostra de sangue sabidamente contaminadas pelo *T. cruzi* (animais no pico de parasitemia e na fase crônica) e uma amostra de sangue de camundongo não infectado. Após extração, as amostras de DNA foram armazenadas a 4°C até a realização da PCR e posteriormente armazenadas a -20°C. Antes da amplificação, a quantidade de DNA de cada amostra foi dosada e uma alíquota foi diluída com água ultrapura, a fim de se ajustar a concentração para 25ng de DNA/µL. Para a realização da PCR, para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR multiplex continha 2 µL de DNA genômico à 25 µg/mL, 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o DNA satélite do *T. cruzi*, (CzFw 5'-CCACCATTCATAATTGGAAACAAA-3'e CzRv 5'-CTCGGCTGATCGTTTTCGA-3'o qual amplifica um produto de 76 pb) e do TNF-α murino (TNF-F 5'-GCCAGACCCTCACACTCA-3' e TNF-R 5'-AACTGCCCTTCCTCCATCTTAAA-3', o

qual amplifica um produto de 69 pb), 0,15 µM de sonda oligonucleotídica para o *T. cruzi* (5'FAM-ACCACAACGTGTGATGC-3'MGB-NFQ) e para o TNF-α (5'VIC-TAAGTGTTCCCACACCTC-3'MGB-NFQ), 5 µL de 2x TaqMan® Universal Master Mix II e 1,3 µL de BSA à 0,25 mg/mL, perfazendo um volume total de 10 µL/reação (RIBEIRO *et al.*, não publicado).

As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™), centrifugadas por 2 minutos a 200 g e levadas ao termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems). O programa de termociclagem consistiu de aquecimento a 95 °C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Cada placa continha um controle negativo da extração (proveniente de *camundongo não infectado*), em duplicata, e um controle negativo da PCR, em duplicata, com água no lugar de DNA.

4.4.6 Métodos utilizados para avaliação da influência do tratamento na resposta imune

Para avaliação da influência no tratamento na resposta imune humoral e celular foram adotados os seguintes procedimentos:

4.4.6.1 Avaliação da influência dos tratamentos na resposta imune humoral

A dosagem de anticorpos da classe IgG total foi realizada pela técnica ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). As amostras de soro foram obtidas a partir de 500µL de sangue dos animais, coletado no seio venoso retro-orbital, 30 e 60 dias após o tratamento. ELISA foi realizada segundo a metodologia descrita por Voller *et al.*, (1976) utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços (*Costar*) sensibilizadas com 100µL/poço de antígeno obtido por lise alcalina de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Triptose). O antígeno foi diluído em tampão carbonato de pH 9,6 e as placas incubadas

overnight a 4 °C. Após a incubação e lavagem das placas (com solução de NaCl 0.9% contendo 0,5% de *Tween* 20), as mesmas foram bloqueadas com 100 µL/poço de PBS com soro fetal bovino, a fim de evitar ligações inespecíficas. Depois de submetidas a uma nova lavagem, as placas foram incubadas com 100µL/poço do soro dos camundongos, na diluição de 1:80, durante 45 minutos a 37 °C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 100µL/poço do conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase. Após nova lavagem, foi adicionada a solução de substrato (3mg de OPD, 3µL de água oxigenada 30 volumes e 15mL de tampão citrato-fosfato) e incubadas a 37°C por cerca de 10 minutos. A reação foi interrompida com adição de 32µL de H₂SO₄ a 2,5 M e a leitura foi feita em leitor de microplacas, a 490nm, imediatamente após a adição do ácido.

Em todas as placas foram incluídos 2 soros de camundongos infectados (controles positivos) e 10 soros de camundongos não infectados (controles negativos). A absorvância discriminante foi determinada pelos valores médios de absorvância referentes aos 10 soros controle negativos somados a dois desvios-padrão. Foi considerada positiva a amostra de soro cuja leitura da absorvância foi maior que a absorvância discriminante.

4.4.6.2 Avaliação da influência dos tratamentos na resposta imune celular

Os níveis séricos de citocinas foram determinados por citometria de fluxo (CBA - cytometric beads array) através do Kit BDT CBA Mouse Th1/Th2/Th17, conforme o protocolo do fabricante. A execução da reação e leituras foram feitas no René-Rachou, em Belo Horizonte, em colaboração com o Prof. Olindo Assis Martins Filho. A detecção das citocinas foi realizada através da adição de anticorpos específicos conjugados com fluorescência (MFI). A quantificação em pg/mg de cada citocina foi baseada em uma curva padrão, realizada com diluições conhecidas, possibilitando a construção de um gráfico de intensidade PF versus pg/mg. A equação gerada a partir desse gráfico possibilitou o cálculo da concentração de citocinas nas amostras. A leitura do teste CBA foi realizada em citômetro de fluxo. As citocinas analisadas foram Interleucina-4 (IL-4), Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-17A (IL-17A),

Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e níveis de proteína Interleucina-10 (IL-10) em um volume reduzido de soro (50 μ L).

4.4.7 Análise estatística

Os resultados dos níveis de parasitemia, níveis de anticorpos, níveis de citocinas, níveis de enzimas e peso dos animais foram expressos como a média \pm desvio padrão para cada conjunto de dados. A normalidade dos dados foi investigada pelo teste D'Agostino-Pearson. Dados paramétricos foram comparados entre grupos por ANOVA seguida de Tukey. Dados não paramétricos foram avaliados por teste T. Os dados foram considerados significativos quando a probabilidade de erro for menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Foram realizadas avaliações *in vitro* para determinar o efeito da utilização do Ravu quando combinado ao Anlo sobre diferentes formas evolutivas da cepa Y de *T. cruzi* e sobre células de mamíferos. O Bz foi utilizado como fármaco de referência.

Apesar de tanto o Ravu quanto o Anlo serem considerados fármacos seguros para uso humano, o uso combinado de ambos nunca foi estudado. Desta forma, inicialmente investigado se haveria efeitos tóxicos resultantes de combinações em diferentes concentrações quando comparadas ao uso isolado sobre células H9c2. É possível notar na Figura 1 que o Anlo apresentou toxicidade significativa, com uma inibição relevante da proliferação das células nas concentrações maiores ou iguais a 25 μM . O Ravu não apresentou nenhum efeito tóxico para as células nas concentrações estudadas. Já as combinações interferiram menos na proliferação das células quando comparadas ao Anlo isoladamente, sugerindo que além de não levar a toxicidade adicional, a associação do Anlo ao Ravu, atenuou seus efeitos tóxicos. Os valores da CC-50 para o Anlo foram de $33,15 \pm 8,7\mu\text{M}$ quando usado isoladamente e $76 \pm 8,5\mu\text{M}$ quando em combinação com o Ravu. Esse efeito fica ainda mais claro quando considerado o índice de seletividade do anlodipino; sendo calculado pela razão entre a CC-50 e IC-50 (sobre formas intracelulares do parasito), quanto maior o valor desse índice, menor a toxicidade. Na ausência ou presença de ravuconazol o índice foi 11,9 e 19,6, respectivamente.

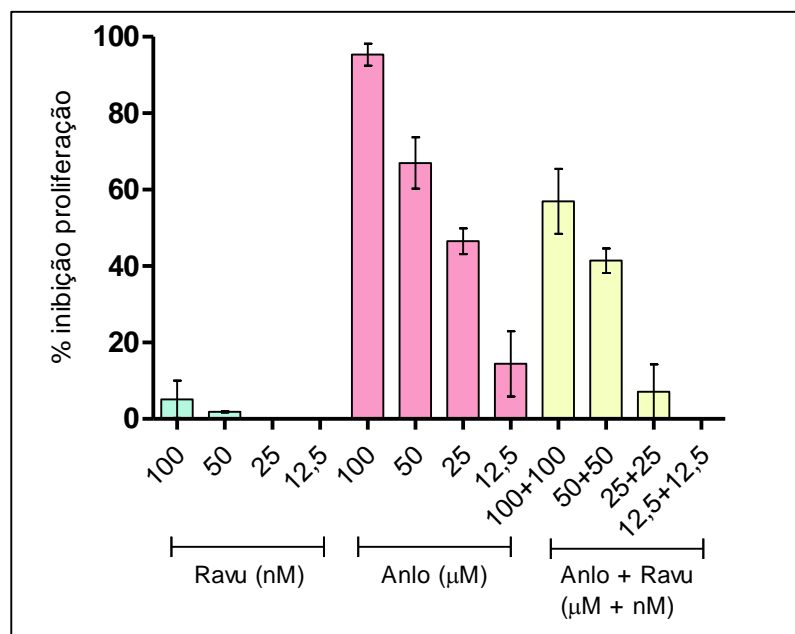


Figura 1 - Efeito do ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapias ou combinação sobre viabilidade das células H9c2. Percentual de inibição de proliferação de células H9c2 tratadas ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapias ou combinação após 48 horas de incubação.

Fonte: Da autora.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de avaliação de citotoxicidade foram estabelecidas as concentrações de cada fármaco para avaliação da atividade tripanocida. A Figura 2 mostra as curvas de dose-resposta dos fármacos quando incubados isoladamente com formas tripomastigotas do parasito. Foi possível observar que o Anlo apresentou atividade tripanocida concentração-dependente e superior à observada para o fármaco de referência (Figura 2). De forma curiosa, o Ravu foi pouco ativo nas concentrações utilizadas, induzindo mortalidade máxima de 40% quando usado a 30nM. Foram obtidos valores de IC-50 de 6,96µM e 14 µM para o Anlo e Bz, respectivamente. Quanto ao Ravu, optou-se por não estimar a IC-50, já que a maior concentração utilizada, 30nM, induziu menos de 50% de mortalidade.

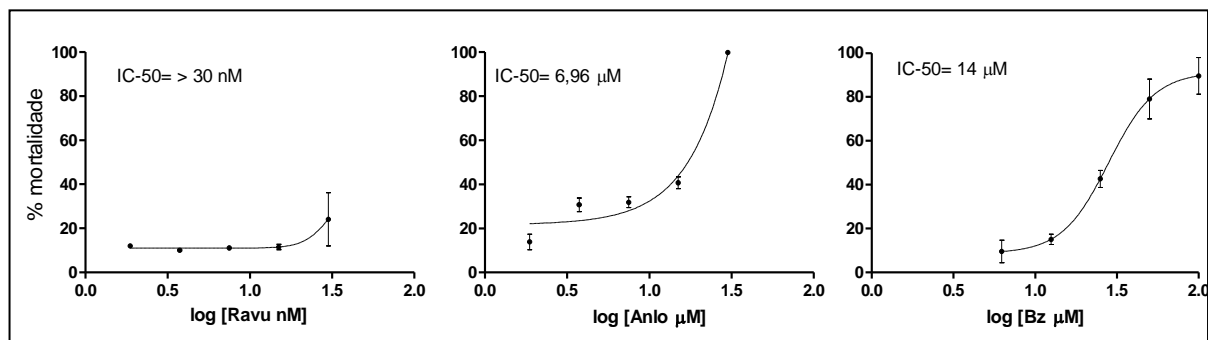


Figura 2 - Atividade dos fármacos sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. 1×10^6 formas de tripomastigotas foram incubadas com concentrações decrescentes de ravuconazol (Ravu), anlodipino (Anlo) ou benznidazol (Bz) por 24 horas. As curvas de dose-resposta foram construídas no *software Prism*.

Fonte: Da autora.

Após definidos os valores de IC-50 dos fármacos isoladamente, o próximo passo foi avaliar o efeito resultante do uso combinado de Ravu e Anlo sobre as formas tripomastigotas. As proporções de cada fármaco na combinação (5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de Ravu:Anlo) foram estabelecidas por meio do método de proporções fixas (5.3.5.2 da seção Material e Métodos), de forma que o valor de IC-50 dos compostos estivesse no ponto médio de uma série de 5 diluições.

Na Figura 3 estão representadas as curvas de dose-resposta resultantes da incubação dos fármacos em diferentes proporções, sobre as formas tripomastigotas. Na Figura 3A é levada em consideração a concentração de Ravu em cada uma das misturas (curvas coloridas) ou isoladamente (curva preta); em 3B o mesmo se aplica ao Anlo.

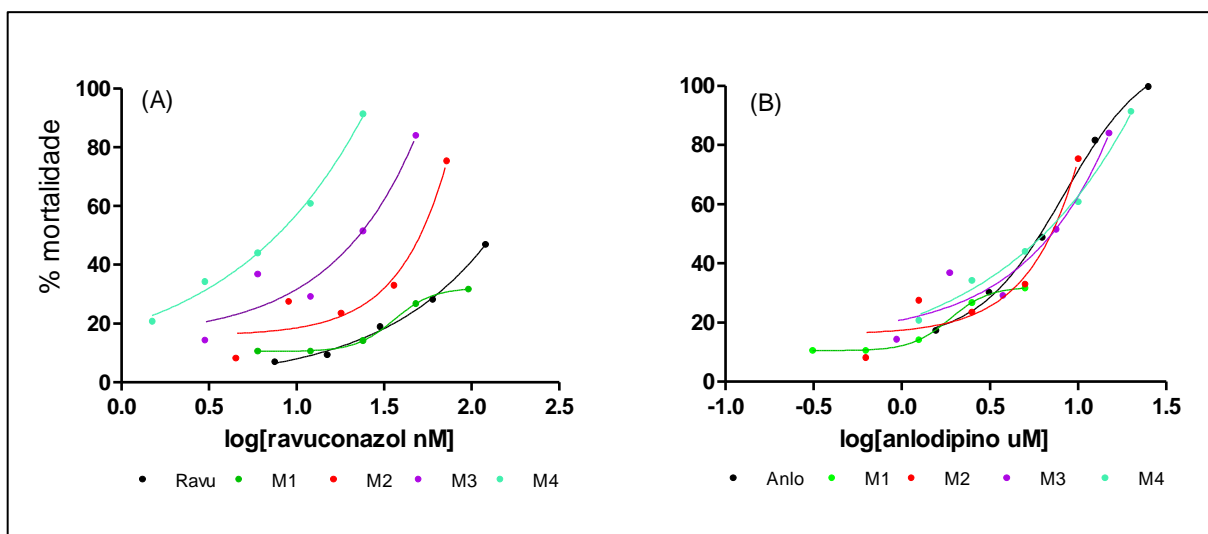


Figura 3- Atividade das combinações de ravuconazol e anlodipino sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. 1×10^6 formas tripomastigotas da cepa Y foram incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de:
 (2A) ravuconazol
 (2B) anlodipino, em diferentes proporções, por 24 horas. As combinações foram preparadas a partir do método de proporções fixas: 5:0; 4:1(M1); 3:2 (M2); 2:3 (M3); 1:4 (M4) e 0:5 partes de ravuconazol:anlodipino. As curvas de dose-resposta foram construídas no software *Prism*.

Fonte: Da autora.

Na Figura 3A observa-se que enquanto o Ravu isoladamente não induziu alta mortalidade, mesmo em concentrações de até 120nM, nas misturas que continham este fármaco associado a maiores proporções de Anlo foi observada atividade superior. Já em 3B as curvas relacionadas ao Anlo e às combinações ficam muito próximas ou denotam índices de mortalidade menores do que o observado para a monoterapia quando avaliados percentuais de inibição mais altos, sugerindo uma interação negativa entre os fármacos (Figura 3A e 3B).

Para confirmar o perfil de interação sugerido nas curvas de dose-efeito, foi calculado o índice de combinação (CI- *Combination Index*) com auxílio do software *Compusyn*. Foram obtidos valores de CI (da IC-50) de $4,01 \pm 0,32$ e $3,61 \pm 0,19$ para as misturas 1 e 2, respectivamente, as quais continham maiores quantidades de Ravu. Esses valores indicam interação antagônica ou próxima do antagonismo. Já para M3 e M4, com maiores concentrações de Anlo, os valores foram $1,41 \pm 0,17$ e $1,99 \pm 0,57$, respectivamente, permitindo indentificar efeito aditivo. Por outro, quando avaliados os valores de CI no nível de 90% de atividade (IC-90), todas as misturas apresentaram valores maiores que 4, sugerindo antagonismo.

Os resultados encontrados com a utilização das formas tripomastigotas foram surpreendentes, visto que o Ravu apresenta, já bem documentada na literatura, alta potência em eliminar formas intracelulares do parasito, com atividade na ordem de nano a subnanomolar. Considerando este fato, foram realizados experimentos utilizando formas intracelulares do parasito.

Na infecção de células H9c2 pelas formas amastigotas intracelulares, observou-se que ambos os fármacos, quando usados isoladamente, apresentaram atividade tripanocida de forma concentração-dependente. O Ravu apresentou maior potência, visto que sua atividade se deu em escala nanomolar, enquanto o Anlo foi ativo em escala micromolar (Figura 4). Os valores de IC-50 determinados foram 2,7 μM e 1,44 nM para Anlo e Ravu, respectivamente. Foi possível ainda estimar os valores de IC-90, sendo de 5,11nM (Ravu) e 19,02 μM (Anlo). O Bz também apresentou, como esperado, atividade anti-*T.cruzi* concentração-dependente e em nível micromolar, com valores de 10,46 μM e 54,7 μM para IC-50 e IC-90, respectivamente (Figura 4).

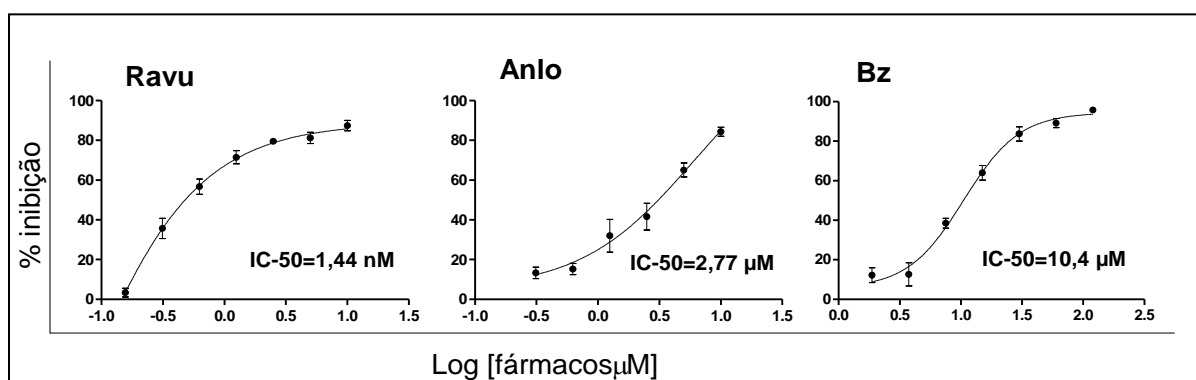


Figura 4 - Atividade dos fármacos sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*. 1×10^4 células foram infectadas com formas tripomastigotas derivadas de cultura e após 24 horas incubadas com concentrações decrescentes de ravuconazol (Ravu), anlodipino (Anlo) ou benznidazol (Bz) por 48 horas. As curvas de dose-resposta foram construídas no software *Prism*.

Fonte: Da autora.

A seguir foi realizada a avaliação do efeito dos fármacos sobre as formas amastigotas quando em combinação, a partir da avaliação do índice endocítico. O índice endocítico considera tanto o percentual de células infectadas quanto a capacidade de proliferação do parasito sob pressão dos fármacos, ou seja, o número de amastigotas por célula. Pelo perfil demonstrado na figura 5 é possível observar que o efeito da combinação em inibir o parasitismo é superior àquele

obtido para o uso isolado de cada fármaco isoladamente, sugerindo uma interação positiva. No entanto, dada a alta potência do Ravu em eliminar as formas amastigotas, a interação entre os fármacos é evidenciada em concentrações desse fármaco menores que 1nM (Figura 5). O benefício da associação é mais evidente em menores concentrações e especialmente em comparação com o Anlo, visto que quando usado isoladamente este fármaco induz alta inibição do parasitismo apenas nas concentrações mais altas.

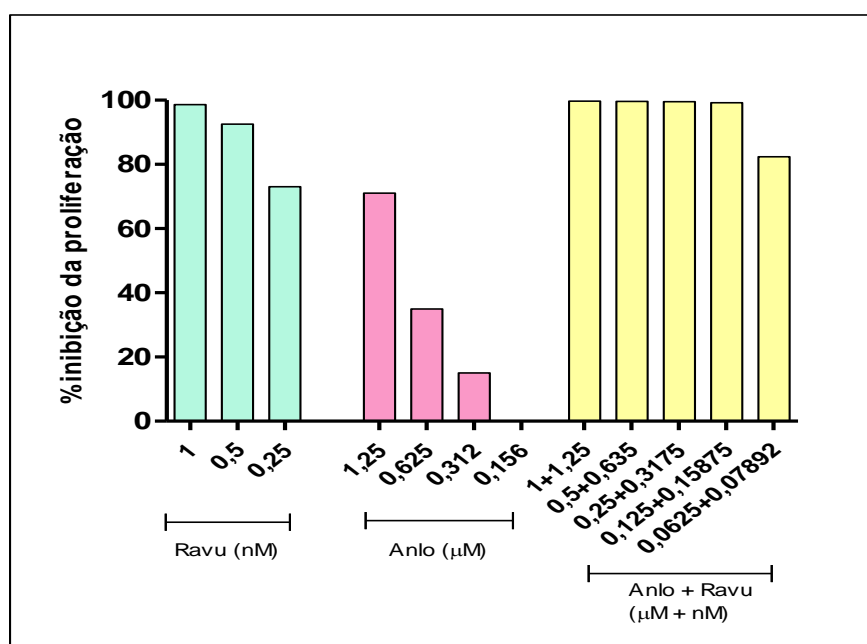


Figura 5 - Atividade do Ravu e do Anlo em monoterapias e combinação sob as formas amastigotas, baseada no índice endocítico. 1×10^4 células foram infectadas com formas tripomastigotas derivadas de cultura e após 24 horas incubadas com concentrações decrescentes de ravuconazol (verde), anlodipino (azul) em monoterapias e combinação (rosa) por 72 horas. O gráfico foi construído no software *Prism*, baseado no cálculo de índice endocítico na presença e ausência de fármacos.

Fonte: Da autora.

A Figura 6 mostra imagens representativas de células H9c2 infectadas e tratadas com as menores concentrações de Ravu e Anlo isoladamente e em combinação, comparativamente às células não tratadas. É possível notar no controle infectado e não tratado (6A) um grande número de amastigotas infectando as células; nas células tratadas com as monoterapias de Ravu (6C) e Anlo (6B) observa-se redução do parasitismo e a combinação dessas mesmas concentrações (6D) reduziu quase por completo o número de amastigotas nas células.

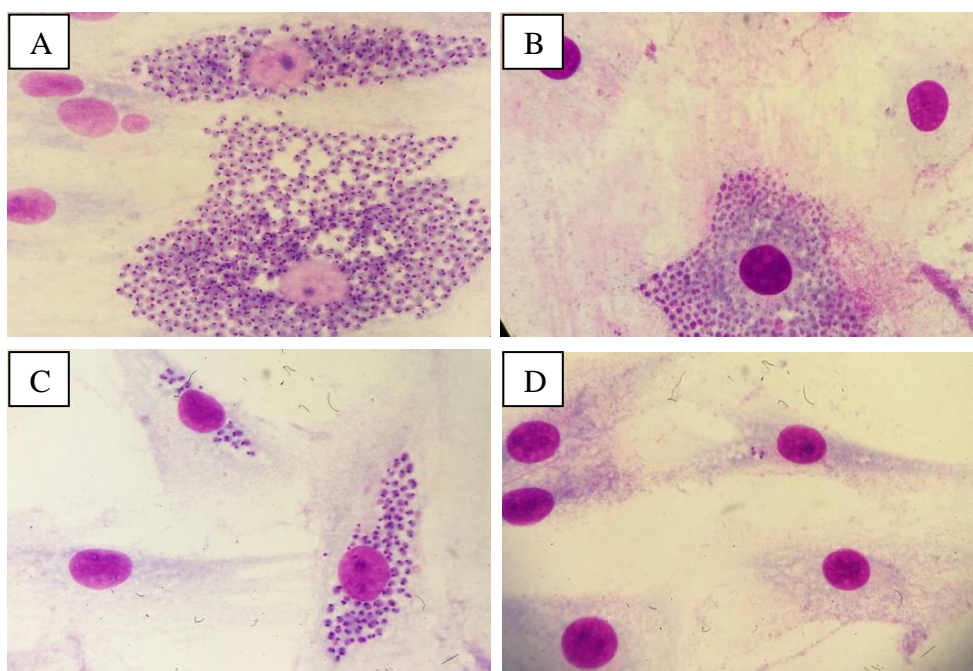


Figura 6 - Células H9c2 infectadas pelas formas amastigotas do *T. cruzi*. Imagem microscópica de células H9c2 infectadas pelas formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* tratadas com:
 (A) controle infectado e não tratado
 (B) anlodipino 0,312 μ M
 (C) ravuconazol 0,25 nM
 (D) anlodipino 0,312 μ M +ravuconazol 0,25 nM

Fonte: Da autora.

Considerando que a avaliação *in vitro* mostrou um efeito positivo resultante da utilização Ravu e do Anlo sobre as células parasitadas, o próximo passo foi investigar a atividade tripanocida de combinações de Ravu e Anlo *in vivo*. Inicialmente foi feita uma análise do potencial de toxicidade do Ravu e Anlo, isoladamente e combinados, usando animais saudáveis. Os fármacos foram bem tolerados, em monoterapia e combinação, não havendo mortalidade. Não foram observados efeitos adversos ao longo do período de tratamento, como queda de pelo, diarreia ou alteração comportamentais, como estresse, agressividade, apatia ou vocalização. A imagem 7 mostra o ganho de peso durante esse período. Foi feita a análise estatística dos grupos de animais não infectados e tratados com relação ao grupo não infectado e não tratado. Nota-se que o ganho de peso observado para o grupo controle não tratado é similar ao observado para os grupos que receberam as monoterapias e diferente do grupo recebeu a combinação, que apresentou um ganho de peso menor ($p < 0,004$) quando comparado ao Ravu e aos animais não tratados.

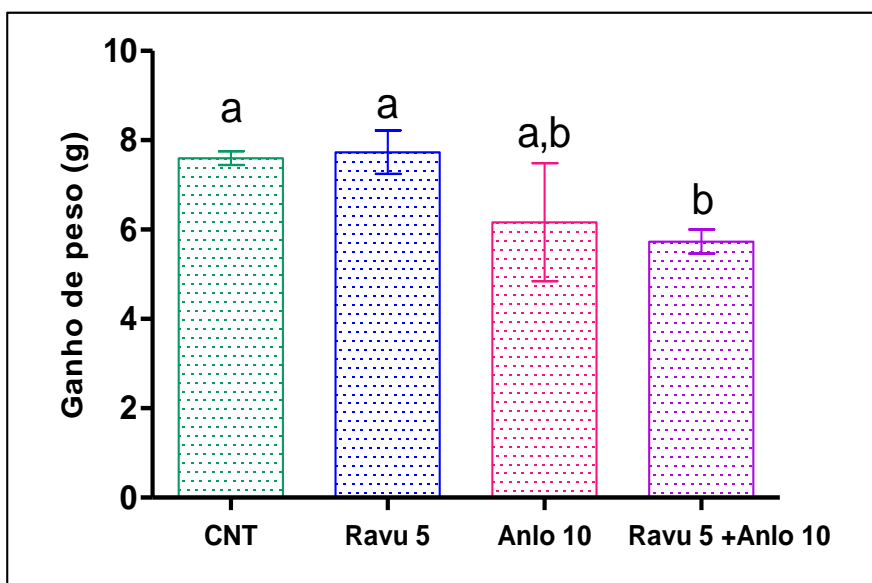


Figura 7 - Efeito dos tratamentos com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou combinação no ganho de peso dos animais. Os animais foram pesados semanalmente durante o período de tratamento com ravuconazol 5mg/Kg (Ravu 5), anlodipino 10mg/Kg (Anlo 10), ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10mg/Kg (Ravu 5+ Anlo 10), dos animais não infectado e não tratado (CNT). Letras iguais indicam semelhança e letras diferentes indicam diferença significativa em relação aos animais não tratados. $p < 0,004$

Fonte: Da autora.

Após o tratamento o ganho de peso dos animais foi recuperado, sendo similar aos animais não tratados (dados não mostrados).

Considerando que as combinações de Ravu (2,5 e 5mg/Kg) e Anlo (10 mg/Kg) foram bem toleradas para o modelo experimental utilizado, foi investigada a influência desses mesmos esquemas terapêuticos na evolução da infecção aguda por *T. cruzi*. Foi utilizada a cepa Y, a qual é altamente virulenta para o camundongo, induzindo altos níveis de parasitemia e mortalidade em um período de cerca de duas semanas.

Ao avaliar a curva de parasitemia do grupo infectado e não tratado foi possível observar um pico de parasitos no 8º dia de infecção, pico característico da cepa utilizada, com uma média de $2042,5 \pm 3893,9 \times 10^3$ parasitos/ 0,1ml de sangue. Nos animais tratados com Anlo também foi observado um pico de parasitemia com o mesmo perfil, porém com valor de $294,37 \pm 300,61 \times 10^3$ parasitos/ 0,1ml de sangue, média significativamente menor ($p < 0,001$) quando comparada ao controle positivo (Figura 8).

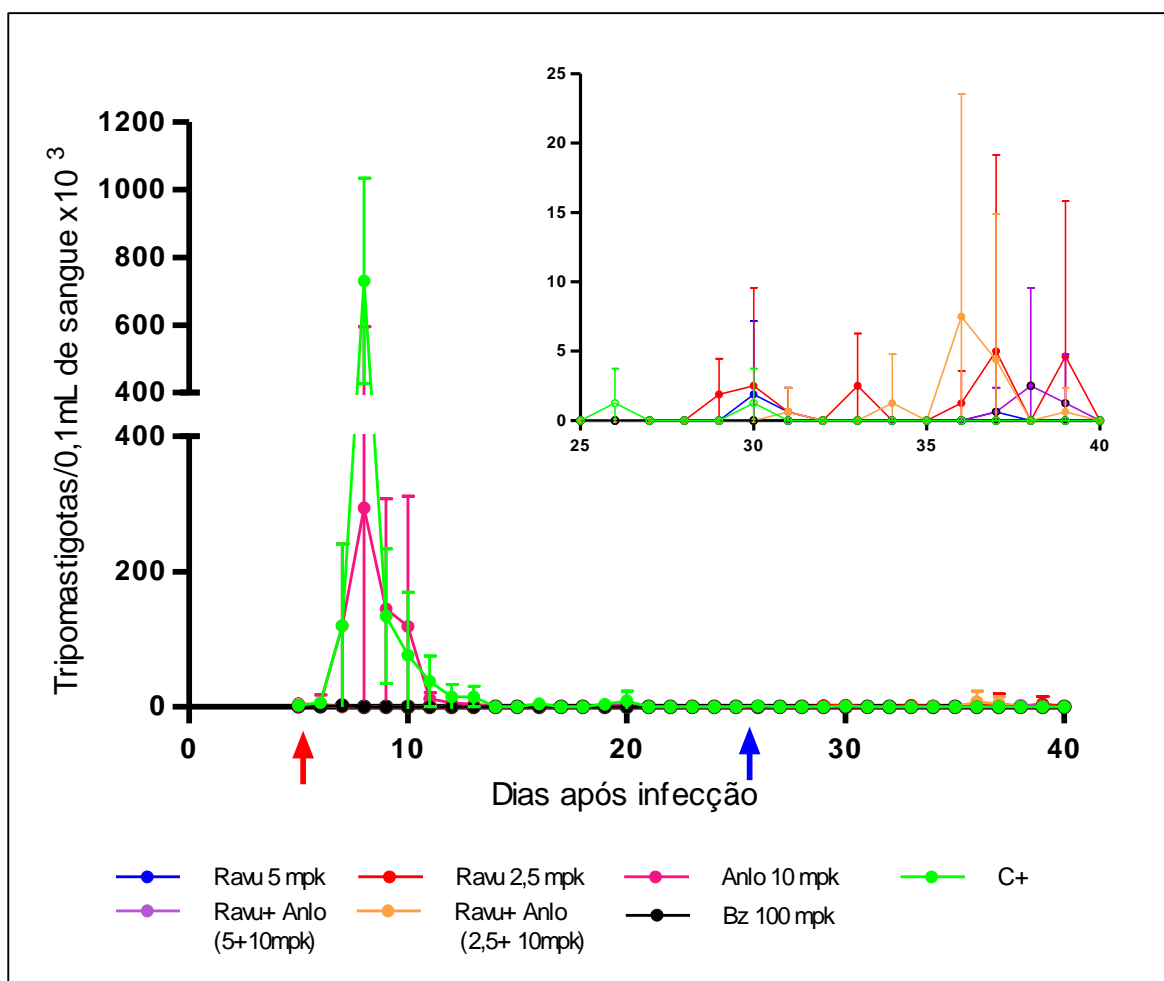


Figura 8 - Curva de parasitemia dos camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi* na presença ou ausência de tratamento. Camundongos *Swiss* fêmeas (n=8/grupo) infectadas foram tratadas, a partir do 5º dia de infecção, com ravuconazol 2,5mg/Kg (Ravu 2,5 mpk); ravuconazol 5mg/Kg (Ravu 5 mpk); anlodipino 10mg/Kg (Anlo 10 mpk); ravuconazol 2,5mg/Kg + anlodipino 10mg/Kg (Ravu 2,5 mpk + Anlo 10 mpk); ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10mg/Kg (Ravu 5 mpk + Anlo 10 mpk) e benznidazol 100mg/Kg (BZ 100 mpk), v.o., por 20 dias consecutivos. C+: grupo controle infectado que não recebeu nenhum tratamento. A parasitemia foi contada em lâminas de exame de sangue a fresco. O inserto evidencia os níveis de parasitemia dos animais após o tratamento. As setas vermelha e azul indicam o início e o final do tratamento, respectivamente.

Fonte: Da autora.

Por outro lado, nos animais tratados com Ravu em monoterapia ou nas combinações com o Anlo, a parasitemia foi rapidamente suprimida a partir do 2º dia de tratamento (Tabela 2). Esses dados confirmam a potência do Ravu em suprimir a proliferação de *T. cruzi* também no contexto *in vivo*.

O efeito positivo dos tratamentos no sentido de reduzir ou suprimir a parasitemia influenciou no ganho de peso dos animais infectados durante o período de tratamento (Figura 9). Foi observado que no grupo de animais não tratados houve

uma perda significativa de peso; em contrapartida, nos animais tratados não houve perda ponderal e o ganho de peso médio foi similar ao identificado para os animais saudáveis. Ainda, em relação aos outros parâmetros avaliados, não foram observados queda de pelo, diarreia ou alterações comportamentais. Desta forma, na presença da infecção, os tratamentos com monoterapias ou combinações de Ravu e Anlo não se mostraram tóxicos e ainda preveniram a perda de peso induzida pela infecção, provavelmente devido à redução da parasitemia.

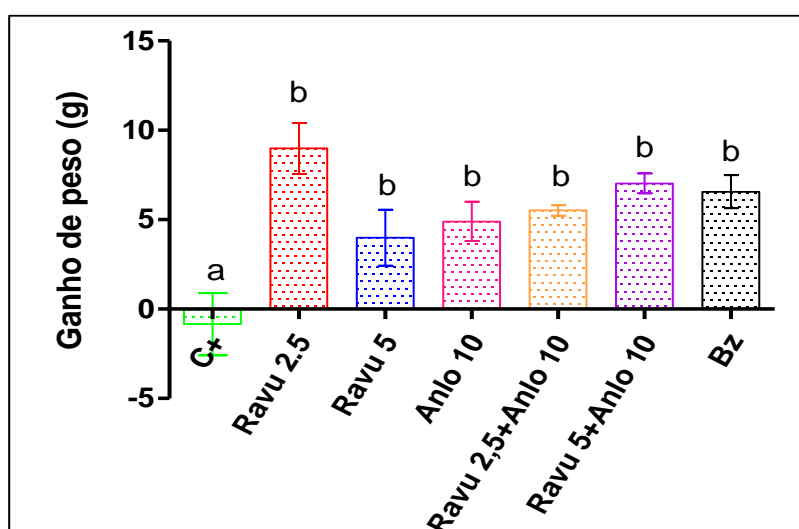


Figura 9 - Efeito no peso dos grupos de animais tratados com ravuconazol (Ravu), anlodipino (Anlo) em monoterapia ou em combinação e do benznidazol (Bz) e no grupo controle positivo. Ganho de peso observado em animais inoculados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com ravuconazol 2,5 mg/Kg (Ravu 2,5); ravuconazol 5 mg/Kg (Ravu 5), anlodipino 10 mg/Kg (Anlo 10), ravuconazol 2,5 mg/Kg + anlodipino 10 mg/Kg (Ravu 2,5+ Anlo 10), ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10 mg/Kg (Ravu 5+ Anlo 10), benznidazol 100 mg/Kg (Bz) e C+ o controle positivo, infectado e não tratado. Os animais foram pesados semanalmente a partir do dia da inoculação e até ao dia da necropsia.

Fonte: Da autora.

Em relação à capacidade dos fármacos em prevenir a mortalidade causada pela infecção, foi observado que em todos grupos nos quais não foram encontrados parasitos no sangue durante o tratamento a sobrevivência foi de 100%, enquanto esse valor foi de 50% para os animais infectados e não tratados, provavelmente devido à alta parasitemia. Já nos animais tratados com Anlo, apesar da redução do pico de parasitemia, foi observada uma mortalidade de 75% (Tabela 2).

Tabela 2 -

Influência do tratamento com Ravu e Anlo, em monoterapia ou combinação, sobre a parasitemia e mortalidade de camundongos infectados pela cepa Y de *T.cruzi*.

Grupo	Supressão ^a	Tempo para supressão ^b	Reativação ^c	Tempo para reativação ^d	Morte ^e
Ravu 5	8/8	2,62 ± 0,91	3/8 (37,5%)	17,66 ± 11,23	0/8
Ravu 2,5	8/8	2,62 ± 0,91	6/8 (75%)	9,5 ± 2,94	0/8
Anlo 10	0/8	-	-	-	6/8
Ravu 5 + Anlo 10	8/8	2,37 ± 0,51	2/8 (25%)	20,5 ± 6,36	0/8
Ravu 2,5 + Anlo 10	8/8	2,5 ± 0,53	3/8 (37,5%)	14,33 ± 2,51	0/8
Bz 100	8/8	2,12 ± 0,35	0/8 (0%)	0 ± 0	0/8
C+					4/8

Legenda: a) Supressão da parasitemia, período de no mínimo 5 dias sem detecção do parasito
 b) Número de dias para alcançar a supressão da parasitemia
 c) Reativação da parasitemia, período de ate 30 dias após o tratamento para detecção de parasitas circulantes no sangue
 d) Número de dias para ocorrer a reativação da parasitemia
 e) Mortalidade dos animais

Fonte: Da autora.

Apesar de os tratamentos serem efetivos em suprimir a proliferação do parasito, após o fim da administração dos fármacos foi possível observar reativação da parasitemia em animais incluídos todos os grupos tratados, indicando 75% e 37,5% de falha terapêutica para Ravu 2,5mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente (Figura 8; Tabela 2). Assim, pôde ser identificado um efeito dose-dependente; quanto maior a concentração de Ravu, maior a eficácia em suprimir o parasitismo. Concordante com esses dados foi o tempo para ocorrer a reativação da parasitemia; enquanto foram necessários em média 9,5 dias após o tratamento para serem detectados parasitos quando foi administrada a menor dose de Ravu, esse valor foi em média de 17,66 dias quando usada a dose de 5mg/Kg (Tabela 2).

Nos grupos tratados com as combinações observaram-se níveis de reativação menores do que aqueles obtidos com as monoterapias, especialmente quando utilizada a menor dose de Ravu. Quando combinados de 5,0mg/Kg de Ravu a 10mg/Kg de Anlo, foi detectada falha terapêutica em 2/8 animais enquanto com Ravu 2,5 mg/Kg esse número foi de 3/8 animais. De forma interessante, a combinação de 2,5mg/Kg de Ravu com 10mg/Kg de Anlo permitiu observar claramente o efeito benéfico da combinação; nesse caso os animais tratados com a

combinação apresentaram 37,5% de reativação, enquanto nos tratados com a monoterapia a reativação foi de 75% (Tabela 2).

Adicionalmente, o número médio de parasitos detectados nos camundongos tratados após a reativação natural da parasitemia foi menor do que aquele observado nos animais não tratados (Figura 8; inserto). A análise da área sob a curva de parasitemia desses animais ao longo de todo o período avaliado (desde a confirmação da parasitemia até 30 dias após o tratamento) confirma esses dados (Figura 10). Todos os animais tratados com Ravu apresentaram área significativamente menor quando comparados àquela obtida para os animais infectados e não tratados e similar ao benznidazol, exceto no grupo tratado com a menor dose em monoterapia (Ravu 2,5mg/Kg). De forma interessante, a área obtida para esse grupo é igual à observada para demais grupos tratados com Ravu, mas maior que a observada para o tratamento de referência com o Bz (100 mg/Kg). Vale ressaltar, porém, que quando combinada ao Anlo, 2,5mg/Kg de Ravu foram suficientes para reduzir a AUC a níveis similares ao Bz. Apesar de o número de parasitos observados no dia do pico de parasitemia dos animais tratados com anlodipino ser significativamente menor do que observado para os animais infectados e não tratados (Figura 10), a AUC de ambos os grupos foi similar.

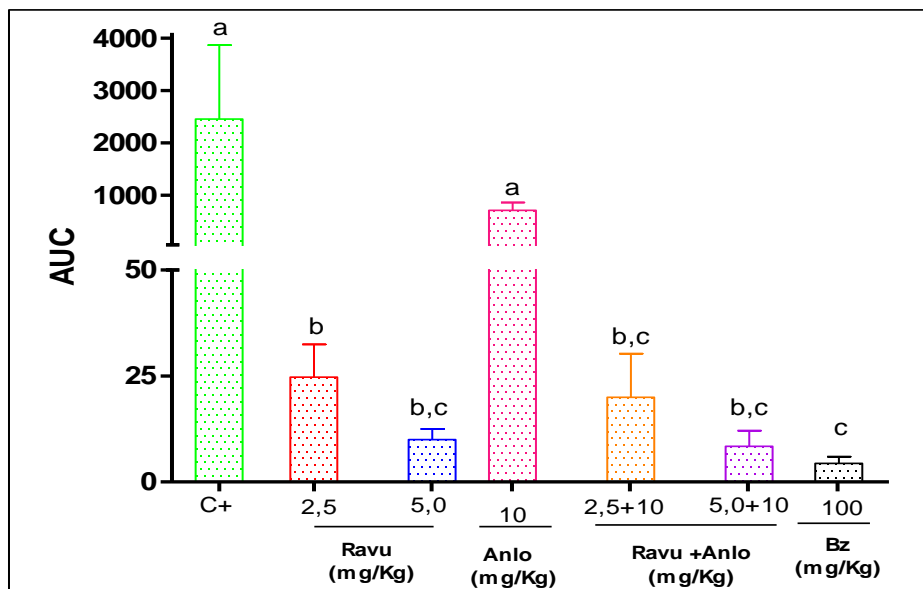


Figura 10 - Área sob a curva do número médio de tripomastigostas/ 0,1 ml de sangue $\times 10^3$ após o tratamento com benznidazol (Bz), ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou em combinação. Letras iguais indicam semelhança e letras diferentes indicam diferença significativa em relação aos animais não tratados. $p < 0,004$.

Fonte: Da autora.

A avaliação dos parâmetros parasitemia e mortalidade durante e após o tratamento mostraram um efeito positivo da combinação, já que o percentual de reativação foi menor e ela ocorreu mais tardiamente do que observado no tratamento com as monoterapias. No entanto, a ausência de parasitemia após o término do tratamento não confirma cura parasitológica. Para avaliar se os animais nos quais não houve reativação da parasitemia foram curados, foi realizada a técnica de PCR em amostras de sangue.

Tabela 3 - Reativação da parasitemia e parâmetros utilizados no controle de cura parasitológica de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

Tratamento	Reativação	PCR negativa	Cura parasitológica
Ravu 5	3/8 (37,5%)	3/5 (60%)	3/8 (37,5 %)
Ravu 2,5	6/8 (75%)	1/2 (50%)	1/8 (12,5%)
Anlo 10	-	-	0/2 (0%)
Ravu 5 +Anlo 10	2/8 (25%)	6/6 (100%)	6/8 (75%)
Ravu 2,5 +Anlo 10	3/8 (37,5%)	4/5 (80%)	4/8 (50%)
Bz 100	0/8 (0%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)

Fonte: Da autora.

Foram considerados curados os animais que apresentaram resultados negativos na PCR. Identificaram-se índices de cura de 12,5% e 37,5% para as monoterapias de Ravu quando administradas as doses de 2,5mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente. Já as combinações induziram 50% de cura quando a dose de Ravu foi 2,5 mpk associada a 10 mpk de Anlo e de 75% quando 5mg/Kg de Ravu foi associado a 10mg/Kg de Anlo. Assim, foi confirmado o efeito benéfico do tratamento combinado, principalmente quando a combinação foi de 2,5mg/Kg de Ravu com 10 mg/Kg de Anlo; pois quando comparada com a monoterapia de Ravu na mesma dose o índice de cura foi quatro vezes maior (Tabela 3).

Considerando o efeito dos tratamentos na redução do parasitismo, foi realizada a análise comparativa dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* entre os grupos em amostras coletadas 30 e 60 dias após o tratamento. A avaliação dos

anticorpos foi realizada em todos os animais, infectados ou não, e submetidos aos diferentes tratamentos. Os resultados da sorologia mostraram que os níveis IgG 30 dias após o tratamento foram semelhantes entre os diferentes grupos tratados e significativamente menores do que aqueles detectados nos soros dos animais do grupo controle infectado e do grupo tratado com a monoterapia de Anlo 10 mg/kg, mas ainda superiores aos detectados no soro dos animais saudáveis, exceto para os camundongos tratados com Ravu 2,5 mg/kg. Já aos 60 dias após o tratamento, apesar de o perfil ser mantido, houve uma tendência de aumento no índice de reatividade para todos os grupo. Novamente foi possível observar que ambas as combinações de Ravu com o Anlo tiveram resultado semelhante ao fármaco de referência, Bz (Figura 11).

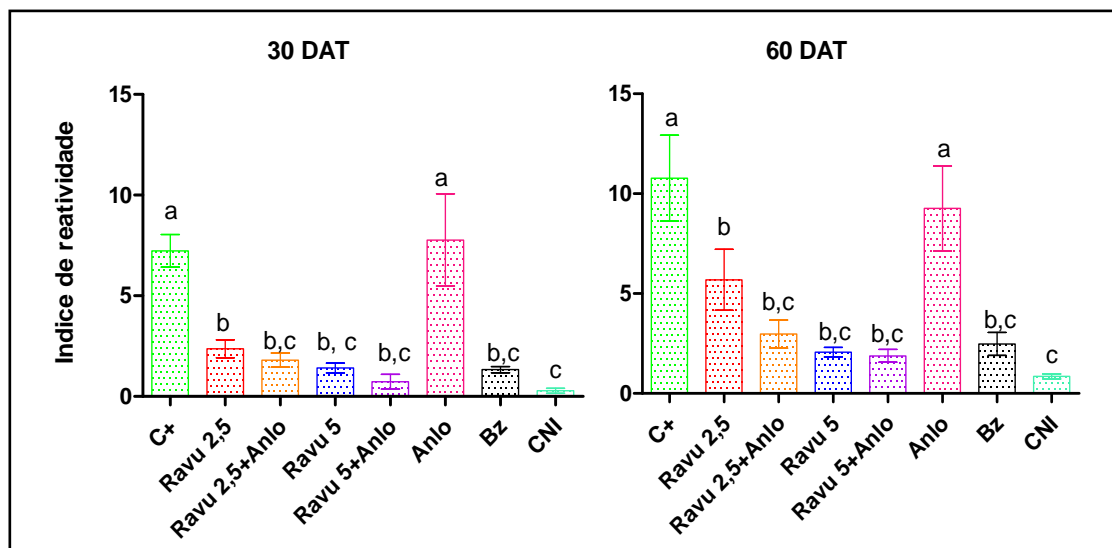


Figura 11 - Avaliação dos níveis de anticorpos da classe IgG total dos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou em combinação, com o benznidazol (Bz), do grupo controle positivo (C+) e controle não infectado (CNI); 30 e 60 dias após o tratamento. Índice de reatividade de anticorpos da classe IgG total dos animais inoculados com a cepa Y de *T. cruzi* 30 e 60 dias após o tratamento, tratados com ravuconazol 2,5 mg/Kg (Ravu 2,5), ravuconazol 2,5 mg/Kg + anlodipino 10 mg/Kg (Ravu 2,5+ Anlo 10), ravuconazol 5 mg/Kg (Ravu 5), ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10 mg/Kg (Ravu 5+ Anlo 10), anlodipino 10 mg/Kg (Anlo 10), benznidazol 100 mg/Kg (Bz), do controle não infectado (CNI) e controle positivo.

Fonte: Da autora.

Considerando a redução da carga parasitária induzida pelos diferentes fármacos, em monoterapia ou combinação, foi investigada a influência dos tratamentos na resposta imune celular dos animais infectados. Para essa avaliação foram considerados apenas os animais tratados com as maiores doses dos

fármacos. As figuras 12 e 13 ilustram os níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias identificados em amostras de soro aos 30 e 60 dias após a infecção, respectivamente.

É possível observar nos gráficos que 30 dias após o tratamento com monoterapia de Ravu 5 mpk e com a combinação de Ravu 5mg/Kg e Anlo 10 mg/Kg, os níveis de produção de TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17, apresentaram uma queda brusca quando comparadas ao grupo controle e ao grupo que recebeu a monoterapia de Anlo 10mg/Kg. De forma interessante, os níveis de TNF- α e IFN- γ observados no grupo tratado com a combinação foram significativamente menores do que as monoterapias com as mesmas doses e similares ao Bz e aos não infectados. As demais citocinas foram significativamente maiores nos grupos que apresentaram maior carga parasitária, ou seja, aqueles tratados com Anlo e os infectados e não tratados (Figura 12).

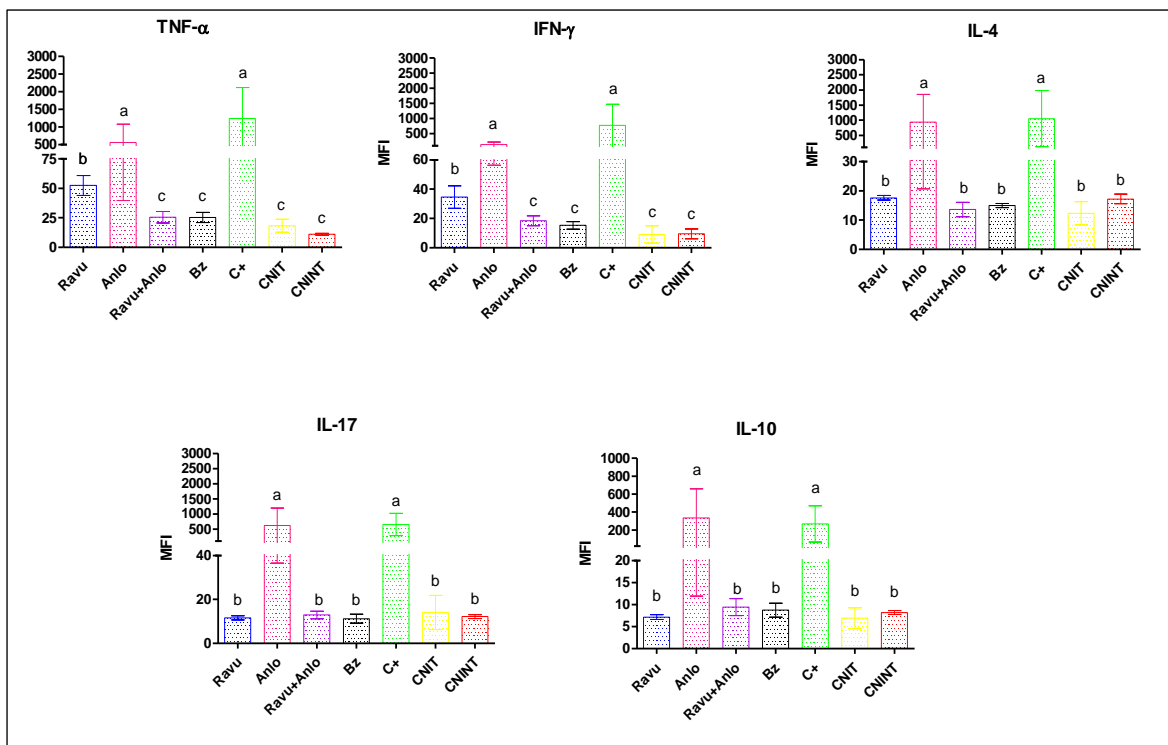


Figura 12 - Efeito dos tratamentos com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou combinação no perfil de citocinas dos animais infectados pela cepa Y de *T. cruzi*; 30 dias após o tratamento. Foi avaliada a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ dos animais tratados com ravuconazol 5mg/Kg (Ravu 5), anlodipino 10mg/Kg (Anlo 10), ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10mg/Kg (Ravu 5 + Anlo 10), benznidazol 100mg/Kg (Bz), controle não infectado e tratado (CNIT) e do controle não infectado e não tratado (CNINT). Letras iguais indicam semelhança e letras diferentes indicam diferença significativa em relação aos animais não tratados.

Fonte: Da autora.

Na figura 13 estão representados os resultados das dosagens dos níveis de produção das citocinas 60 dias após os tratamentos; de forma geral, nota-se uma redução na intensidade de fluorescência (eixo Y) em todos os grupos quando comparados aos valores observados aos 30 dias após o tratamento. Considerando as citocinas TNF- α , IL-10 e IL-17, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos. Já os níveis de IL-4 foram maiores apenas no grupo tratado com Anlo 10mg/Kg. De forma interessante, o grupo de animais que recebeu a combinação de Ravu 5mg/Kg e Anlo 10mg/Kg exibiu níveis de IFN- γ significativamente menores do que os observados nos animais infectados e não tratados e similares aos animais não infectados.

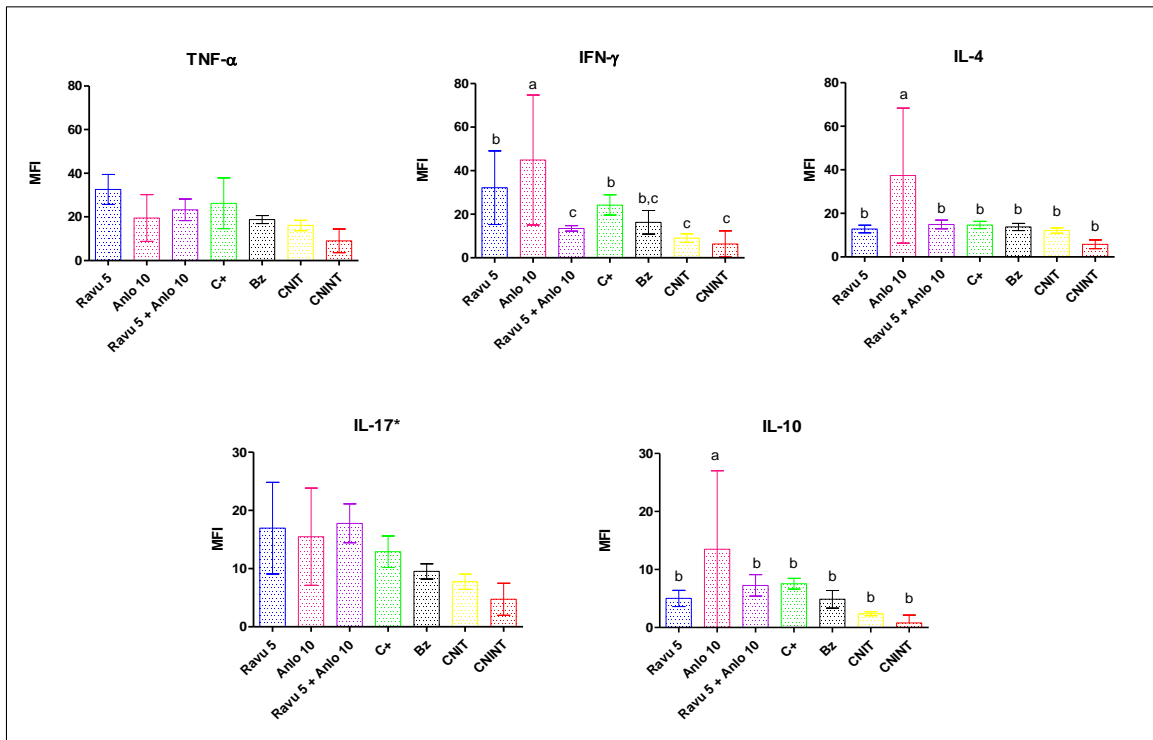


Figura 13 - Efeito dos tratamentos com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou combinação no perfil de citocinas dos animais infectados pela cepa Y de *T. cruzi*; 60 dias após o tratamento. Foi avaliada a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ dos animais tratados com ravuconazol 5mg/Kg (Ravu 5), anlodipino 10mg/Kg (Anlo 10), ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10mg/Kg (Ravu 5 + Anlo 10), benznidazol 100mg/Kg (Bz), controle não infectado e tratado (CNIT) e do controle não infectado e não tratado (CNINT). Letras iguais indicam semelhança e letras diferentes indicam diferença significativa em relação aos animais não tratados.

Fonte: Da autora.

Por fim, após a necropsia foi avaliada a relação entre a massa do fígado e massa total de cada animal. Foi possível observar que os animais que receberam a terapia combinada de Anlo com ambas as doses de Ravu, apresentaram um valor

similar ou até menor que o grupo que recebeu o tratamento com o fármaco de referência, Bz. De forma interessante, os fígados dos animais tratados com as combinações foram significativamente menores do que aqueles tratados com as monoterapias e similares aos animais não infectados. Dentre os não infectados e tratados ou não, as médias foram similares. Esses resultados sugerem que não houve toxicidade hepática adicional resultante do uso das combinações (Figura 14).

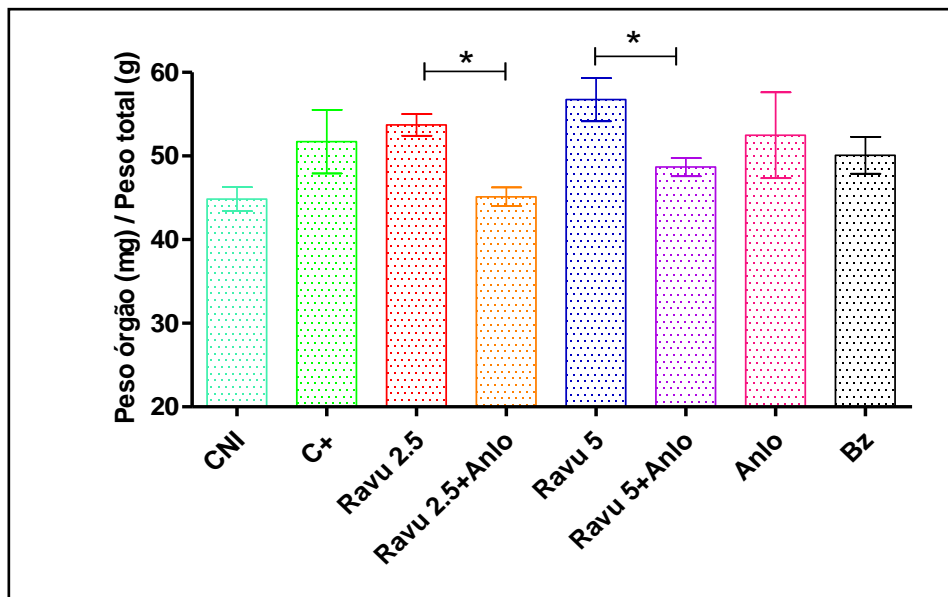


Figura 14 - Avaliação do peso do fígado (mg)/ peso total (g) dos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com ravuconazol (Ravu) e anlodipino (Anlo) em monoterapia ou em combinação, com o benznidazol (Bz), do grupo controle positivo (C+) e controle não infectado (CNI); 60 dias após o tratamento. Peso do fígado (mg)/ peso total (g) do dos animais inoculados com a cepa Y de *T. cruzi*, tratados com ravuconazol 2,5 mg/Kg (Ravu 2,5), ravuconazol 2,5 mg/Kg + anlodipino 10 mg/Kg (Ravu 2,5+ Anlo 10), ravuconazol 5 mg/Kg (Ravu 5), ravuconazol 5mg/Kg + anlodipino 10 mg/Kg (Ravu 5+ Anlo 10), anlodipino 10 mg/Kg (Anlo 10), benznidazol 100 mg/Kg (Bz), do controle não infectado (CNI) e controle positivo. Asteriscos indicam diferença significativa em relação à monoterapia.

Fonte: Da autora.

Os resultados apresentados demonstram a potente atividade da combinação de Ravu com Anlo em reduzir a carga parasitária de animais infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e contribuem para ampliar os dados acerca da avaliação pré-clínica de combinações de fármacos na quimioterapia da doença de Chagas.

6 DISCUSSÃO

O reposicionamento e a combinação de fármacos são consideradas estratégias de desenvolvimento farmacológico muito promissoras, sendo particularmente relevantes nos estudos de quimioterapia de doenças negligenciadas, a exemplo da doença de Chagas. Neste trabalho foram estudados os efeitos anti- *T. cruzi* resultantes de associações de dois fármacos reposicionados, o Ravu e o Anlo, os quais apresentam atividade tripanossomicida já estabelecida (URBINA, 2003; PALIT E ALI, 2008; REIMÃO et al. 2016; DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2018; TORRICO et al., 2018), no entanto não são capazes de induzir cura parasitológica quando usados em monoterapia. Nossos dados corroboraram a atividade anti-*T. cruzi in vitro* de ambos os fármacos quando usados isoladamente sobre formas amastigotas intracelulares do parasito. O Ravu apresentou potência elevada, com concentrações efetivas em escala nanomolar, assim como observado por Urbina et al. (2003) e De Figueiredo Diniz et al. (2018). O Anlo também apresentou atividade compatível com a descrita na literatura, em escala micromolar (REIMÃO et al., 2010; 2014; PLANER et al., 2014).

De forma interessante, ao avaliarmos a atividade dos fármacos sobre formas tripomastigotas derivadas de cultura celular, o Ravu não apresentou o mesmo perfil. Foram necessárias concentrações cerca de 50 vezes maiores para induzir o mesmo efeito observado para as formas intracelulares (Figura 2). Há diversos trabalhos na literatura que abordam a atividade tripanossomicida de derivados azólicos promissores, incluindo o posaconazol e o Ravu (MOLINA et al., 2000; URBINA et al., 2003; VEIGA-SANTOS et al., 2012; DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2018); no entanto, os estudos *in vitro* são feitos com formas epimastigotas e amastigotas. Nosso estudo relata pela primeira vez a atividade do Ravu sobre formas tripomastigotas, sendo essa atividade significativamente reduzida. Por outro lado, o Anlo foi eficaz em induzir alta mortalidade após 24 horas de incubação com o parasito, com valores de IC-50 de 6,96 μM , confirmando dados de outros autores (REIMÃO et al., 2010).

O Ravu é um antifúngico que inibe a enzima C-14 α -demetilase (CYP51), a qual catalisa uma importante reação na via de biossíntese do ergosterol, o esterol de membrana predominante do parasito (URBINA, 2003; BUCKNER, 2008). Já o Anlo

parece agir aumentando as ROS e levando à ativação da cascata apoptótica (REIMÃO et al., 2014). Essas diferenças nos mecanismos de ação dos fármacos podem contribuir para explicar o perfil de atividade dos mesmos sobre as diferentes formas evolutivas; enquanto o Ravu teria atividade predominante sobre formas proliferativas do parasito (URBINA et al., 2010), o Anlo teria atividade sobre todas as formas evolutivas, em função do mecanismo de ação mais direto. São escassos, na literatura, trabalhos que avaliam novos fármacos sobre formas evolutivas diferentes do parasito e, de maneira geral, os valores de IC-50 para tripomastigotas são maiores que para amastigotas (SOEIRO et al., 2012; GARCÍA et al. 2016; SEGUE et al., 2016). Considerando que ambas são formas evolutivas relevantes para o desenvolvimento da doença humana, esses dados indicam a necessidade de avaliação de novos fármacos em modelos *in vitro* mais abrangentes. Em relação ao Bz, o medicamento de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas, ele apresentou atividade tripanocida sobre todas as formas do parasito, corroborando dados da literatura (COURA E DE CASTRO, 2002).

Como fármacos desenvolvidos originalmente para terapia antifúngica e cardiovascular, respectivamente, o Ravu e o Anlo já apresentam dados de segurança pré-clínicos e clínicos bem estabelecidos (OSTERLOH, 1989; TORRICO et al., 2018). No entanto, é necessária a investigação acerca do potencial citotóxico adicional resultante dos fármacos quando combinados. Em nosso estudo, utilizando a H9c2, uma linhagem de cardiomioblasto de rato, como modelo de célula hospedeira, a combinação não apresentou toxicidade adicional. Pelo contrário, houve uma atenuação da toxicidade do Anlo. Isoladamente, esse fármaco mostrou-se tóxico quando em concentrações maiores que 25 μ M, com valores de IC-50 33,15 \pm 8,7 μ M e índice de seletividade de 11,9, resultados condizentes com outros relatos da literatura (PALIT E ALI, 2008; PLANER et al., 2014). Já o Ravu não apresentou toxicidade, com valores estimados de IC-50 acima de 400nM. Quando usados em combinação, o índice de seletividade aumentou para 19,6, indicando um efeito protetor. Não foram realizadas avaliações bioquímicas e moleculares para elucidar o que levou à proteção, mas podem ser sugeridos fenômenos de competição entre os fármacos; nesse caso a presença do ravuconazol reduziria o acesso do anlodipino à célula. Ainda assim, os índices de seletividade obtidos são inferiores ao preconizado na literatura (50) para o prosseguimento de avaliações pré-clínicas de novos tratamentos anti-*T.cruzi* (ROMANHA et al., 2010; CHATELEIN and KUMAR,

2017). No entanto, o fato de serem medicamentos já utilizados ou aprovados para uso humano respalda a utilização.

A avaliação *in vitro* da atividade anti-*T.cruzi* das combinações de ravu e anlo foi realizada inicialmente sobre formas tripomastigotas utilizando o método de proporções fixas (FIVELMAN et al., 2004). Por meio desse método pode ser identificada a atividade de 4 misturas dos fármacos, em diferentes proporções. A classificação da natureza da interação entre os fármacos foi realizada por meio do cálculo do índice de combinação, também referido como Σ FIC (*fractional inhibitory concentration*). Nessa interpretação, valores de índices de combinação $\leq 0,5$ referem-se a misturas sinérgicas; $0,5 < \text{índice de combinação} < 4,0$ indicam ausência de interação, enquanto valores ≥ 4 indicam interações antagônicas (DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2018). Nossos resultados mostraram que não houve interação, considerando 50% de atividade, o que é chamado de efeito aditivo. No entanto, quando se considera a IC-90, os índices de combinação são superiores a 4 nas diferentes misturas, indicando interação antagônica. De forma curiosa, quando avaliamos os fármacos combinados sobre células parasitadas por formas amastigotas, a interação foi sinérgica, independente do nível de atividade (IC-50 ou IC-90). As células tratadas com os fármacos em combinação, mesmo em concentrações muito baixas, apresentaram parasitismo significativamente menor do que o observado para o uso separado (Figura 5). Esses resultados podem novamente ser reflexo do mecanismo de ação dos fármacos, onde o ravuconazol é menos eficaz em induzir a morte de formas extracelulares do parasito e ainda, extrapolando os resultados vistos no experimento de toxicidade, pode haver um menor acesso do Anlo às formas tripomastigotas em função da presença do Ravu.

Seguel et al. (2016) ao testarem a combinação de pentamidina, uma droga antiprotozoária, associada ao fármaco de referência, Bz, sobre formas tripomastigotas e amastigotas, observou que a pentamidina antagonizou o efeito do Bz. No entanto, em modelo animal, não houve efeito antagônico ou sinérgico. Já García et al. (2016) encontraram efeito sinérgico entre Bz e clomipramina, um antidepressivo, sobre as formas tripomastigotas e amastigotas. O mesmo efeito foi observado *in vivo*, havendo redução da carga parasitária e proteção contra danos cardíacos nos animais tratados com a combinação. Resultados conflitantes *in vitro in vivo* podem estar relacionados principalmente a fatores relacionados à

farmacocinética e farmacodinâmica da combinação. Apesar de os experimentos *in vitro* evidenciarem aspectos importantes na interação dos fármacos, ainda não há, nos estudos de quimioterapia experimental da doença de Chagas, modelos preditivos robustos o bastante para eliminar a experimentação animal (CHATELAIN e KUMAR, 2017; DE FIGUEIREDO DINIZ et al., 2018). Adicionalmente, dados da literatura demonstram que terapia de combinação usando bloqueadores de canais de cálcio associados a derivados azólicos e outras classes farmacológicas apresenta potencial promissor em aumentar a eficácia antiparasitária do tratamento etiológico *in vitro* (NEAL et al., 1989; PLANER et al., 2014) e *in vivo* (PLANER et al., 2014). Considerando a escassez de dados na literatura e os resultados promissores da combinação *in vitro*, foi avaliado o potencial tripanocida de combinações do Ravu e do Anlo em modelo murino. As doses dos fármacos foram escolhidas de acordo com dados da literatura; foram usadas concentrações subótimas de Ravu (2,5 e 5,0 10mg/Kg) associadas a 10mg/Kg de Anlo. A administração desses esquemas terapêuticos, por 20 dias consecutivos a animais saudáveis, mostrou-se segura, visto que não foram observadas reações adversas relevantes. Não houve queda de peso em nenhum animal, e, apesar do menor ganho de peso dos animais (Figura 7) durante o período de tratamento com Anlo e com a combinação, após o término do tratamento o peso foi recuperado.

No modelo utilizado de infecção aguda, os camundongos não tratados apresentaram altos níveis parasitêmicos, com pico de parasitemia característico no 8º dia após a infecção (Figura 4, Tabela 2) e 50% de mortalidade ainda nas primeiras semanas após o inóculo. O tratamento com anlodipino foi eficaz em reduzir significativamente o número de parasitos no dia do pico de parasitemia, dado este concordante com a atividade anti-tripomastigota observada *in vitro*. Há apenas um trabalho na literatura que avaliou o efeito *in vivo* do Anlo sobre *T. cruzi*; Planer et al. (2014) demonstraram que o Anlo não apresentava nenhum efeito tripanocida durante a fase aguda. Essas diferenças podem estar relacionadas ao modelo experimental utilizado, já que utilizamos camundongos *Swiss* infectados pela cepa Y, enquanto Planer et al. (2014) estudaram camundongos *Balb/c* infectados pela cepa *Tulahuen*. Ainda, essas discrepâncias evidenciam a necessidade de avaliação de novos fármacos sobre diferentes cepas do parasito (ZINGÁLES et al., 2014).

Apesar de o Anlo em monoterapia reduzir a proliferação do parasito nos

primeiros dias após a infecção, os valores de área sob a curva (Tabela 2) foram similares aos animais infectados e não tratados e 75% dos camundongos vieram a óbito. Esse fato pode estar relacionado ao parasitismo ao longo da infecção; algum evento relacionado à ação do fármaco pode ter atuado em conjunto com a infecção já que nenhuma reação inesperada foi observada durante o tratamento dos animais saudáveis com o mesmo fármaco. Ainda, os animais sobreviventes não apresentaram perda de peso como a observada para os animais na ausência de tratamento (Figura 5), provavelmente devido à redução do parasitismo no pico de parasitemia. Considerando a ação farmacológica principal do Anlo, bloqueador de canais de cálcio tipo L, o qual leva ao relaxamento da musculatura arterial, o efeito hipotensor pode ter agido em sinergismo com as alterações hemodinâmicas resultantes da infecção e processo inflamatório associado, levando os animais à óbito. Estão sendo realizadas avaliações da pressão arterial e cinética de citocinas em animais infectados e tratados com anlodipino; esperamos, a partir destes dados responder os motivos da mortalidade aumentada quando do tratamento com Anlo em monoterapia. De forma importante, quando o Anlo foi administrado junto ao Ravu para os animais infectados, não foram observados efeitos adversos ou mortalidade.

Com relação ao uso do Ravu em monoterapia, ambas as doses (2,5mg/Kg e 5mg/Kg de Ravu) induziram supressão da parasitemia em 100% dos animais. Esse efeito na proliferação do parasito teve impacto positivo na sobrevivência, já que 100% dos animais sobreviveram durante todo o período avaliado, dados concordantes com os de Urbina et al. (2003). Apesar da potente supressão do parasitismo induzida pelo Ravu, após o término do tratamento foi detectada reativação da parasitemia nos animais tratados, de maneira dose-dependente. Considerando ainda os resultados da PCR realizada em amostras de sangue, foram observados índices de cura de 37,5% e 12,5% para as doses de 5 mg e 2,5 mg de Ravu/Kg, respectivamente. Urbina et al. (2003) não observaram efeito dose-dependente com a utilização do mesmo fármaco; ao administrarem doses de 10 a 30 mg/kg/dia por 43 dias, esses autores observaram índices de cura maiores (70%) com a dose de 10 mg/Kg. Ainda, DE FIGUEIREDO DINIZ et al. (2018), ao avaliarem o efeito tripanossomicida *in vivo* do E1224, um pró-fármaco do Ravu, não observaram relação dose-efeito; usando doses de 10 a 50mg/kg de peso, os maiores índices de cura foram observados com a menor dose. Em nosso estudo, provavelmente por utilizarmos doses menores, foi

possível observar efeito de dose-resposta, já demonstrado em estudos com fungos (CLEMONS e STEVENS, 2001). Ainda, os menores índices de cura obtidos em nosso estudo, utilizando a mesma cepa do parasito, podem ser justificados tanto pelas doses menores quanto pelo tratamento durante um menor número de dias (20 dias). Vale ressaltar que utilizamos uma metodologia para avaliação do parasitismo mais estridente, considerando os resultados da PCR em tempo real, uma técnica de grande sensibilidade.

A análise da relação entre a massa do fígado e massa total de cada animal foi feita para averiguar se ocorreu toxicidade hepática adicional resultante do uso das combinações. Foi observado que o tratamento com as combinações foi benéfico, pois os fígados dos animais estavam menores do que o controle positivo e mais próximo do controle não infectado. O mesmo foi observado para a monoterapia de Anlo; esses dados corroboram com os achados de Palit e Ali (2008) que também observaram uma diminuição no peso do fígado dos animais tratados com Anlo quando comparados ao grupo controle (Figura 15). Apesar do ganho de peso ligeiramente menor nos animais não infectados e tratados com a combinação de maior dose (Figura 2), os tratamentos com combinações de Ravu e Anlo, ao reduzirem a proliferação do parasito preveniram a perda de peso causada pela infecção. Os animais infectados e tratados ganharam peso de maneira similar aos animais não infectados, diferentemente daqueles infectados e não tratados; neste caso, os camundongos que não sucumbiram à infecção apresentaram acentuada perda de peso (Figura 5). Ainda, não foram observados outros efeitos adversos nos animais infectados, demonstrando aparentemente baixa toxicidade resultante dos tratamentos combinados.

Considerando cura parasitológica como ausência de parasitemia detectada por exame de sangue a fresco e resultados negativos na PCR de amostras de sangue, nossos resultados mostraram percentuais de cura, resultantes da associação dos fármacos, duas a quatro vezes maiores que aqueles observados para as monoterapias de Ravu (Tabela 3). Esse efeito positivo pode estar relacionado aos diferentes mecanismos de ação dos fármacos testados em induzir a morte do parasita, fato esse que também contribuiria para diminuir a chance de desenvolvimento de resistência ao tratamento. Enquanto o Anlo apresenta ação mais relevante sobre formas tripomastigotas, o Ravu apresenta grande potência sobre as

formas amastigotas intracelulares, por meio da inibição da biossíntese de ergosterol, indispensável para a proliferação do parasito. Ainda, devem ser consideradas possíveis interações farmacocinéticas entre ambos. O Anlo é ser amplamente metabolizado no fígado em metabólitos inativos pela CYP3A4, a enzima primária responsável pelo metabolismo deste fármaco (<http://www.anvisa.gov.br/datavisa>). O Ravu é um inibidor da CYP3A4; deste modo pode ser sugerido que a administração de Ravu aumenta as concentrações plasmáticas de Anlo e, portanto, a exposição sistêmica, havendo mais fármaco disponível para exercer o efeito tripanocida. Planer et al. (2014) estudaram o efeito do tratamento com Anlo associado ao posaconazol, outro antifúngico azólico, na infecção pela cepa Tulahuen, evidenciando efeito sinérgico.

Na ausência de cura parasitológica, o tratamento etiológico pode levar a benefícios em casos de redução da carga parasitária. O desenvolvimento das lesões características da doença de Chagas está atrelado a um processo inflamatório que é inicialmente desencadeado pelo parasito. Em função da persistência do parasito e estimulação antigênica constante, há miocitólise, reação inflamatória crônica e fibrose, sendo esses fenômenos amplificados por reações autoimunes (TEIXEIRA et al., 2011). A redução da carga parasitária, mesmo na ausência de eliminação total do parasito, pode levar a benefícios clínicos, como já demonstrado em diversos trabalhos na literatura, tanto em estudos pré-clínicos como clínicos (GARCIA et al., 2016, para revisão ver BAHIA et al., 2014). Nossos resultados sugerem uma redução significativa da carga parasitária nos animais tratados com ravuconazol e com a combinação a partir dos valores de AUC obtidos para os animais não curados, o que poderia levar a um impacto positivo no contexto de progressão das lesões tissulares. A avaliação da resposta imune humoral dos animais confirmou a redução do parasitismo demonstrada pela avaliação parasitológica. Foi investigado o efeito do tratamento com Ravu e Anlo em monoterapia e combinados, na produção de IgG aos 30 e 60 dias após o tratamento. Foi verificado que o tratamento combinado foi efetivo em atenuar a reatividade plasmática de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, já que níveis dos anticorpos aos 30 dias após a infecção encontraram-se significativamente menores do que o observado para os animais não tratados e ao Anlo. A alta reatividade observada no grupo tratado com a monoterapia de Anlo se deve ao fato do fármaco não ter promovido a supressão da parasitemia durante o

tratamento, apesar da redução da parasitemia no dia do pico (Figura 9). Os parasitos são capazes de desencadear inúmeras alterações na resposta imune e os anticorpos IgG respondem contra as formas sanguíneas do parasito (LEVIN et al., 1989; GARCIA et al., 2005). Em um período mais tardio, 60 dias após o tratamento, observamos um leve aumento da reatividade plasmática dos anticorpos, provavelmente devido ao estímulo causado pelos parasitos naqueles animais que não foram curados e tiveram uma reativação da parasitemia após os tratamentos. A resposta humoral não é normalmente usada como critério de cura em avaliações com curto tempo de seguimento, já que os níveis de anticorpos, em função dos fenômenos de memória imunológica, podem necessitar de mais longo tempo para soroconversão negativa (BAHIA et al., 2012).

Para que não ocorram danos teciduais, deve haver um equilíbrio na resposta imune do hospedeiro. Esses danos muitas vezes não estão relacionados somente ao parasito, mas sim a uma resposta imune exacerbada e não modulada (MACHADO et al., 2004). Dessa forma, é salutar a avaliação dos perfis de resposta celular em resposta aos tratamentos. Sendo uma doença imune mediada, enquanto um perfil pró-inflamatório é necessário para favorecer a eliminação do parasito, a exacerbação deste fenótipo pode levar à lesão tissular. As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e o TNF- α fazem parte da primeira linha de defesa do organismo do hospedeiro, já que ambas estimulam a produção de óxido nítrico (NO) que promove a eliminação do parasito (TALVANI, et al., 2004). Nos primeiros dias a infecção é acompanhada por um aumento significativo dessas citocinas e de NO, seguido por uma drástica redução dos mesmos (REVELLI et al., 1999; TARLETON, 2007). A atividade do IFN- γ na infecção com *T. cruzi* está relacionada à sua capacidade em induzir a produção de IL-12, TNF- α e principalmente óxido nítrico nos macrófagos ativados que controlam a replicação intracelular do parasita. Assim, TNF- α e IFN- γ contribuem para aumentar a destruição de parasitos por macrófagos, diminuindo a quantidade de parasitos circulantes e protegendo outras células da infecção. (VESPA, et al., 1994; ARAÚJO & CASTRO, 2000; TALVANI, et al. 2004). Por outro lado, a resposta antiparasitária deve ser potente o bastante para eliminar o parasito, mas regulada ao ponto de não causar injúrias ao próprio organismo. Então, para evitar possíveis lesões aos tecidos infectados, respostas pró-inflamatórias desencadeadas por *T. cruzi* são contrabalanceadas por respostas anti-inflamatórias

desencadeadas principalmente pelas citocinas IL-10 e IL-4 (HUNTER et al., 1997; FLAVELL & LI, 2008). Em nosso estudo foi observado que, de forma geral, os níveis de citocinas pró-inflamatórias encontrados aos 30 dias após o tratamento estão de acordo com esses eventos, uma vez que nos animais tratados com Ravu e Bz a concentração de citocinas foi significativamente menor quando comparadas aos animais infectados e não tratados. De forma interessante, os níveis de IFN e TNF daqueles tratados com as combinações foram ainda menores que os observados para as monoterapias e similares aos animais não infectados, sugerindo efeito benéfico. Em uma nova análise do perfil de citocinas dos mesmos animais, porém aos 60 dias após o tratamento, os níveis de citocinas foram inferiores àqueles identificados aos 30 dias após o tratamento, sobretudo nos grupos Anlo e controle infectado e não tratado, sugerindo uma modulação resultante da cronificação da infecção. Nesse período, os níveis de IFN observados no plasma dos camundongos infectados e tratados com a combinação foram significativamente menores aos observados para as monoterapias e para os animais infectados e não tratados, mostrando a influência, a longo prazo, do tratamento realizado na fase aguda. Ainda, os níveis de IL-17 do grupo tratado com a combinação foram menores do que os observados para o tratamento de referência, com benznidazol. A infecção pelo parasito resulta no aumento da produção dessa interleucina pelos linfócitos TCD4+, CD8+ e células Natural Killer (MIYAZAKI et al., 2010). Sousa et al (2017) mostraram que esta citocina tem papel imunomodulador na fase crônica da doença de Chagas e pode contribuir para a proteção contra o dano cardíaco.

Em conjunto nossos resultados mostraram que há efeito positivo resultante da associação de Anlo e Ravu *in vivo*, com redução da carga parasitária e influência na resposta imune dos animais. Torrico et. al (2018), publicaram dados do ensaio clínico de Fase II, feito na Bolívia, que avaliou a eficácia do E1224, uma pró-droga solúvel do Ravu, em induzir a cura da infecção crônica. Foi mostrado que mesmo sendo capaz de suprimir a parasitemia, o fármaco não foi capaz de induzir a cura; o tratamento dos pacientes durou 8 semanas e após uma semana já foi possível observar a redução da parasitemia, porém esse efeito não se manteve quando o tratamento foi interrompido. Os autores então sugeriram que deve-se se estender o tratamento por um período mais prolongado, para haver uma resposta sustentada, além da importância de novos estudos desse fármaco em combinação. Esses dados

ênfatizam a relevância da estratégia de combinação de outros medicamentos com o Ravu. Nossos dados corroboram esses achados clínicos e permitem sugerir que aumentando o tempo de tratamento dos animais possivelmente observaríamos maiores índices de cura. De qualquer forma, considerando que ambos os fármacos são aprovados para uso humano, os resultados obtidos são bastante promissores.

Os resultados obtidos ampliam os dados pré-clínicos em quimioterapia experimental anti-*T. cruzi* e confirmam que a estratégia de reposicionamento aliada à combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação é uma estratégia promissora para os estudos de novos tratamentos para a doença de Chagas.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos permitiram:

- a) Confirmar a atividade anti-parasitária dos fármacos *in vitro* sobre cardiomiócitos infectados pela cepa Y de *T.cruzi*;
- b) Evidenciar a importância da forma evolutiva do parasito nos estudos de determinação da natureza da interação entre fármacos;
- c) Concluir que a combinação entre ravuconazol e anlodipino não induz efeitos tóxicos adicionais;
- d) Identificar efeito dose-dependente na ação do ravuconazol sobre o modelo de infecção murina aguda pela cepa Y de *T. cruzi*;
- e) Concluir que há efeito positivo resultante da combinação usando ravuconazol e anlodipino *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, Darrell R.; SCHWARTZ, Janice B. Calcium-antagonist drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 19, p. 1447-1457, 1999.
- APT, Werner et al. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 133-138, 1998.
- ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673, 2004.
- BAHIA, Maria Terezinha; DINIZ, Livia de Figueiredo; MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225-1237, 2014.
- BARRETT, Michael P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol Epidemiol**, v. 46, n. 21, 2015
- BRAGA, M. Socorro et al. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 3, p. 157-161, 2000.
- BRENER, Z. et al. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 6, p. 389-396, 1962.
- BRENER, Z. Laboratory-acquired Chagas disease: comment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 527, 1987.
- BUCKNER, Frederick S. Sterol 14-demethylase inhibitors for Trypanosoma cruzi infections. **Drug Targets in Kinetoplastid Parasites**, p. 61-80, 2008.
- CANÇADO, J. Romeu. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.
- CHAGAS, Carlos. Nova entidade morbida do homem: resumo geral de estudos etiologicos e clinicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, n. 2, p. 219-275, 1911.
- CHONG, Curtis R.; SULLIVAN, David J. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.

CLEMONS, Karl V.; STEVENS, David A. Efficacy of ravuconazole in treatment of mucosal candidosis in SCID mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3433-3436, 2001.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COURA, José Rodrigues; DE CASTRO, Solange L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

DA MATTA GUEDES, Paulo Marcos et al. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in dog hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4286-4292, 2004.

DE FIGUEIREDO DINIZ, Lívia et al. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2979-2986, 2010.

DE FIGUEIREDO DINIZ, Lívia et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DE FIGUEIREDO DINIZ, Lívia et al. Outcome of E1224-benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant *Trypanosoma cruzi* strain in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e00401-18, 2018.

DE FÁTIMA OLIVEIRA, Maria et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas disease. In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. **ISBT, Brazil – SBHH**, p.49-80, 1992.

DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. FIOCRUZ, 1997.

DIAS, João Carlos Pinto et al. II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. ESP, p. 7-86, 2016.

Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). **Drug Trial for Leading Parasitic Killer of the Americas Shows Mixed Results but Provides New Evidence for Improved Therapy**. Washington, 2013. Disponível em: <<https://www.dndi.org/2013/media-centre/press-releases/e1224>>. Acesso em: 18 set 2017.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. In: **Federation Proceedings**. p. 2471-2476. 1986.

DUTRA, Walderez O.; GOLLOB, Kenneth J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 287, 2008.

DYBUL, Mark et al. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. Recommendations of the panel on clinical practices for treatment of HIV. **MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports**, v. 51, n. RR-7, p. 1-55, 2002.

ESPUELAS, S. et al. Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 25, p. 4259-4288, 2012.

ESTANI, S. Sosa et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 4, p. 526-529, 1998.

FABBRO DE SUASNÁBAR, Diana et al. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 99-109, 2000.

FAUNDEZ, Mario et al. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 126-130, 2005.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FERREIRA, Humberto de Oliveira. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 209-211, 1990.

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**, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.

FIVELMAN, Quinton L.; ADAGU, Ipemida S.; WARHURST, David C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and

proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097-4102, 2004.

FÜGI, Matthias A. et al. Match-making for posaconazole through systems thinking. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 46-51, 2015.

GARCÍA, Mónica Cristina et al. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3700-3708, 2016.

GARCIA, Simone et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

GARCÍA, Mónica Cristina et al. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3700-3708, 2016.

GASCON, Joaquim; BERN, Caryn; PINAZO, María-Jesús. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1, p. 22-27, 2010.

HALL, Belinda S.; BOT, Christopher; WILKINSON, Shane R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HATA, Katsura et al. In vitro and in vivo antifungal activities of ER-30346, a novel oral triazole with a broad antifungal spectrum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2237-2242, 1996.

HIROTA, Kenichiro et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by nimodipine, with low cytotoxicity to host cells. **Tropical Medicine and Health**, v. 32, n. 2, p. 181-188, 2004.

HOTEZ, P. J. et al. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. **Lancet (London, England)**, v. 368, n. 9550, p. 1865-1866, 2006.

HUNTER, Christopher A. et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 7, p. 3311-3316, 1997.

KAISER, Marcel et al. Antiprotozoal activity profiling of approved drugs: a starting point toward drug repositioning. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015.

KROEMER, Guido; DALLAPORTA, Bruno; RESCHE-RIGON, Michèle. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 619-642, 1998.

- KUMAR, K. Asok et al. Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 285-292, 2003.
- LANA, Marta de 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1139-1147, 2009.
- LAURIA-PIRES, Liana et al. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 3, p. 111-118, 2000.
- LEVIN, Mariano J. et al. Identification of major Trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 5, p. 530-538, 1989.
- LI, Ming O.; FLAVELL, Richard A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- β and interleukin-10. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 468-476, 2008.
- LIENHARDT, Christian et al. New drugs for the treatment of tuberculosis: needs, challenges, promise, and prospects for the future. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. suppl_2, p. S241-S249, 2012.
- MACHADO, Paulo RL et al. Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.
- MARIN-NETO, J. Antonio et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319-324, 2009.
- MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.
- MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103, 2016.
- MENNA-BARRETO, Rubem Figueiredo Sadok; DE CASTRO, Solange Lisboa. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- MIYAZAKI, Yoshiyuki et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1150-1157, 2010.
- MONCAYO, Álvaro; SILVEIRA, Antonio Carlos. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009.

MORAES, Karen; DINIZ, Livia F.; BAHIA, Maria Terezinha. Role of cyclooxygenase-2 in Trypanosoma cruzi survival in the early stages of parasite host-cell interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 181-191, 2015.

MOREIRA, A. A. et al. Evaluation of the therapeutic activity of itraconazole in chronic infections, experimental and human, by Trypanosoma cruzi. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 34, n. 2, p. 177-180, 1991.

MORILLO, Carlos 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**, v. 69, n. 8, p. 939-947, 2017.

NEAL, R. A. et al. Reversal of drug resistance in Trypanosoma cruzi and Leishmania donovani by verapamil. **Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 197-198, 1989.

NOVAES, Rômulo Dias et al. Curcumin enhances the anti-Trypanosoma cruzi activity of benznidazole-based chemotherapy in acute experimental Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3355-3364, 2016.

ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

OSTERLOH, Ian. The safety of amlodipine. **American Heart Journal**, v. 118, n. 5, p. 1114-1120, 1989.

PERIN, Luísa et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02410-16, 2017.

PLANER, Joseph D. et al. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against Trypanosoma cruzi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2977, 2014.

RAJAO, Matheus Andrade et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309-321, 2014.

REIMÃO, Juliana Q.; SCOTTI, Marcus T.; TEMPONE, André G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1, 4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure-activity relationship study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 8044-8053, 2010.

REIMÃO, Juliana Quero et al. Investigation of Calcium Channel Blockers as Antiprotozoal Agents and Their Interference in the Metabolism of Leishmania (L.) infantum. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

RICH, Peter R.; MARÉCHAL, Amandine. The mitochondrial respiratory chain. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 1-23, 2010.

- PALIT, Partha; ALI, Nahid. Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1, 4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 374-377, 2008.
- REVELLI, Silvia et al. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4, 6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 85, n. 2, p. 147-150, 1999.
- SBARAGLINI, Maria Laura et al. Neglected tropical protozoan diseases: drug repositioning as a rational option. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 2201-2222, 2016.
- SCHOFIELD, Chris J.; JANNIN, Jean; SALVATELLA, Roberto. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.
- SEGUEL, Verónica et al. Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect in vitro, and lacks of synergy in vivo: Implications about the polyamine transport as an anti-*Trypanosoma cruzi* target. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 23-32, 2016.
- SEN, Nilkantha et al. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 8, p. 924, 2004.
- SILVA, L. H. P., NUSSENZWEIG. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folha Clin & Biol**, v. 20, p. 191-208, 1953.
- STORDEUR, P. et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 259, n. 1-2, p. 55-64, 1 jan. 2002.
- SUN, Wei; SANDERSON, Philip E.; ZHENG, Wei. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 7, p. 1189-1195, 2016.
- TALVANI, André et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor— α in chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 7, p. 943-950, 2004.
- TARLETON, R.L. Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol.**, 19(4): 430-4, 2007.
- TEMPONE, André Gustavo et al. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)**, v. 5, n. 3, p. 222-235, 2007.
- TORRICO, F.; GASCON, J.; RIBEIRO, I. E1224—Results of proof of concept clinical trial in patients with chronic indeterminate Chagas disease. In: **Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2013.

- URBINA, Julio A. et al. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1771-1777, 1998.
- URBINA, Julio A. et al. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 27-38, 2003.
- URBINA, Julio A.; DOCAMPO, Roberto. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
- URBINA, Julio A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009.
- URBINA, Julio A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta tropica**, v. 115, n. 1, p. 55-68, 2010.
- URBINA, Julio A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149-156, 2015.
- VAN CAUTEREN, H. et al. The toxicological properties of itraconazole. **Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents**. Beers, Belgium: Prous Science Publishing Co, p. 101-108, 1987.
- VESPA, G. N.; CUNHA, Fernando Q.; SILVA, Joao S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994.
- VIOTTI, Rodolfo et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 151-162, 1994.
- VIOTTI, Rodolfo et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724-734, 2006.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. N. N. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 53, n. 1, p. 55, 1976.
- ZINGALES, Bianca et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828-833, 2014.
- WILKINSON, Shane R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

WITEK, Piotr 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO technical consultation. **Geneva: World Health Organization**, v. 33, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Control of Chagas' disease: second report of the WHO Expert Committee on Chagas' disease**. World Health Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates= Maladie de Chagas en Amérique latine: le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.