

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VALQUIRIA ANGELIS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE AVALIAÇÃO *IN VITRO*
APLICÁVEL À VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- *TRYPANOSOMA CRUZI* DE
CANDIDATOS A FÁRMACOS.**

Alfenas/MG

2021

VALQUIRIA ANGELIS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE AVALIAÇÃO *IN VITRO*
APLICÁVEL À VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- *TRYPANOSOMA CRUZI* DE
CANDIDATOS A FÁRMACOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Livia de Figueiredo Diniz

Alfenas/MG

2021

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

Fernandes, Valquiria Angelis
F363d Desenvolvimento de uma estratégia de avaliação *in vitro* aplicável à
verificação do potencial anti- *Trypanosoma cruzi* de candidatos a
fármacos. / Valquiria Angelis Fernandes – Alfenas, MG, 2021.
52 f.: il. –

Orientadora: Lívia de Figueiredo Diniz.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade
Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Recidiva. 3. *In vitro*. I. Diniz, Lívia de
Figueiredo. II. Título.

CDD- 616.9363

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

VALQUIRIA ANGELIS FERNANDES

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE AVALIAÇÃO *in vitro* APLICÁVEIS À VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- *Trypanosoma cruzi* DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS.

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2021.

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Fabiane Matos dos Santos
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo - Ufes

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Livia de Figueiredo Diniz Castro, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2021, às 19:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivo Santana Caldas, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 08:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiane Matos dos Santos, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0470062** e o código CRC **F690FBD7**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e amigos pela paciência e entendimento de trilhar os últimos dois anos junto a mim. Agradeço a todos os colegas de pós-graduação que direta ou indiretamente me ajudaram, ensinaram e motivaram a realizar este trabalho. Também à minha orientadora Livia Diniz pela dedicação, esforço, profissionalismo e carinho com que me guiou. E aos professores e funcionários do Departamento de Patologia e Parasitologia por todo apoio nessa caminhada. Obrigada a todos que não me deixaram fraquejar e manter minha fé e força para que completasse mais essa fase tão importante em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

A falha terapêutica observada nos estudos clínicos com os candidatos a fármacos tripanossomicidas mais promissores até então estudados evidenciaram a necessidade de maior compreensão sobre os fatores que interferem na seleção e análise de novos candidatos a fármacos para a doença de Chagas. No entanto, o valor translacional das estratégias de *screening* no âmbito da experimentação *in vitro* tem sido pouco explorado. Neste sentido, os objetivos do presente estudo são avaliar a influência do tipo celular hospedeiro na atividade anti- *T. cruzi* de fármacos e subsidiar a padronização de uma estratégia *in vitro* de alto valor translacional para identificação do potencial terapêutico de novas moléculas. Foram utilizadas duas linhagens celulares, Vero e H9c2, infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*, incubadas ou não com fármacos de reconhecida ação tripanossomicida *in vitro* e *in vivo*, o benznidazol, medicamento de referência, e os candidatos, avaliados em estudos clínicos, fex-sulfona, ravuconazol e posaconazol. Este modelo foi utilizado primeiramente para determinação dos valores de EC-50 e EC-90 dos fármacos comparativamente nos dois tipos celulares em ensaios de 48 horas utilizando placas de 24 poços. Posteriormente, foi desenvolvido um ensaio em placas para verificar a supressão e a recrudescência do parasitismo após tratamento prolongado *in vitro*. Para padronização dessa estratégia foram utilizados os mesmos modelos celulares e fármacos, no entanto, as células foram mantidas em placas de 90mm e tratadas por 7 dias, quando foram submetidas ao *washout*. As placas foram avaliadas diariamente por microscopia óptica até 12 dias após o tratamento para detecção da recrudescência do parasitismo. Após esse período as células foram coletadas para a determinação da carga parasitária por *qPCR*. Os resultados obtidos sugerem que a atividade dos fármacos é influenciada pelo tipo celular, sendo os valores de EC-50 no mínimo duas vezes menor para a linhagem Vero. Esse perfil foi confirmado no ensaio de placas, no qual foi possível detectar supressão do parasitismo durante o tratamento com todos os fármacos e recrudescência após o tratamento com nitroimidazólicos em ambos os tipos celulares. No entanto, a recrudescência em H9c2 ocorreu anteriormente, e a carga parasitária detectada por *qPCR* pós-incubação com os nitroimidazólicos e ravuconazol foi significativamente menor nas células Vero. Os resultados obtidos sugerem que o tipo celular hospedeiro influencia na reposta do parasito aos fármacos e permitiram a identificação de uma estratégia *in vitro* aplicável à seleção de candidatos ao tratamento da doença de Chagas antes da progressão para estudos pré-clínicos *in vivo*.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Recrudescência. *In vitro*

ABSTRACT

The failure observed in clinical studies with the most promising trypanosomal drug candidates to date has shown the need for greater understanding of the factors that interfere in the selection and analysis of new drug candidates for Chagas disease. However, the translational value of screening strategies in the field of *in vitro* experimentation has been little explored. In this sense, the objectives of the present study are to evaluate the influence of the host cell type on the anti-*T. cruzi* activity of drugs and to support the standardization of an *in vitro* strategy of high translational value for identifying the therapeutic potential of new molecules. Two cell lines were used, Vero and H9c2, infected by the Y strain of *T. cruzi*, incubated or not with drugs of recognized trypanosomicidal action *in vitro* and *in vivo*, benznidazole, reference drug, and those selected in clinical studies, fex -sulfone, ravuconazole and posaconazole. This model was used mainly for the determination of the EC-50 and EC-90 values of the drugs comparatively in the two types of cell phones in 48-hour trials using 24-well plates. Subsequently, a plate test was developed to verify the suppression and recrudescence of parasitism after prolonged *in vitro* treatment. To standardize this strategy, the same cell models and drugs were used, however, as cells were kept in 90mm plates and treated for 7 days, when they were subjected to *washout*. The plates were evaluated daily by optical microscopy up to 12 days after treatment for detection of parasitism reactivation. After that period, cells were collected to determine the parasitic load by *qPCR*. The results obtained suggest that the activity of the drugs is influenced by the cell type, with the EC-50 values at least twice lower for the Vero strain. This profile was confirmed in the plaque assay, in which it was possible to detect suppression of parasitism during treatment with all drugs and reactivation after treatment with nitroimidazoles in both cell types. However, reactivation in H9c2 occurred previously, and the parasitic load detected by post-incubation *qPCR* with nitroimidazoles and ravuconazole was significantly lower in Vero cells. The results obtained suggest that the host cell type influences the response of the parasite to the drugs and allowed the identification of an *in vitro* strategy applicable to the selection of candidates for the treatment of Chagas disease before progressing to preclinical studies *in vivo*.

Keywords: Chagas disease. Recrudescence. *In vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental do ensaio para determinação das concentrações de EC-50 e 90 dos fármacos benznidazol, fex-sulfona, ravuconazol e posaconazol.....	23
Figura 2 -	Delineamento experimental do ensaio em placas de Petri para verificação da supressão e recrudescência do parasitismo <i>in vitro</i>	24
Figura 3 -	Curva de dose-efeito da atividade tripanossomicida do posaconazol, ravuconazol, fex-sulfona e benznidazol sobre a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	31
Figura 4 -	Área sob a curva de inibição resultante de diversos fármacos sobre a infecção de células H9c2 e vero pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	32
Figura 5 -	Fotomicrografias representativas de células H9c2 e vero infectadas pela cepa Y incubadas ou não com os fármacos benznidazol (3,75µM) e posaconazol (0,125µM).....	33
Figura 6 -	Curva padrão gerada a partir da diluição seriada 1:10 do DNA proveniente de 2×10^4 parasitos/µL em DNA genômico de pool de células não infectadas (VERO + H9C2) para estimativas da eficiência de amplificação e limite de quantificação do ensaio de PCR em tempo real quantitativa.....	40
Figura 7 -	PCR em tempo real quantitativa. Resultados de carga de DNA parasitário observados em sobrenadante de raspado de culturas celulares infectadas por <i>T. cruzi</i> e submetidas ou não a diferentes fármacos. *p<0,05; **p<0,006; ns-não significativo. C+ - células infectadas e na ausência de fármaco; Bz- benznidazol, Sfn- fex-sulfona, Rv- ravuconazol, Ps- posaconazol, Alo- alopurinol:controle de ineficácia.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fármacos e reagentes.....	22
Tabela 2 -	Influência do tipo celular hospedeiro na atividade tripanossomicida de fármacos com diferentes mecanismos de ação.....	33
Tabela 3 -	Supressão, recrudescência e quantificação do parasitismo de células H9c2 e Vero infectadas pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> e incubadas com fármacos que apresentam diferentes mecanismos de ação.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	GENERALIDADES E IMPACTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	13
2.2	TRATAMENTO ETIOLÓGICO.....	14
2.3	NOVAS ALTERNATIVAS.....	15
2.4	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DINÂMICA DA INFECÇÃO.....	16
3	JUSTIFICATIVA	20
4	OBJETIVOS	21
4.1	OBJETIVO GERAL.....	21
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1	CEPA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	22
5.2	FÁRMACOS E REAGENTES.....	22
5.3	CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	22
5.4	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	23
5.4.1	Obtenção do parasito	24
5.4.2	Determinação do EC-50 e EC-90 dos fármacos nos diferentes tipos celulares infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	25
5.4.3	Ensaio in vitro em placas	25
5.4.3.1	<i>Infecção e tratamento</i>	25
5.4.3.2	<i>Follow-up</i>	26
5.4.3.3	<i>Quantificação da carga parasitária pós-follow up</i>	27
5.4.3.3.1	Extração de DNA genômico de culturas celulares infectadas ou não por <i>T. cruzi</i>	27
5.4.3.3.2	Padronização de estratégia de quantificação de DNA pelo método do Ct comparativo.....	27
5.4.3.3.3	PCR em tempo real quantitativa.....	28
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA DO RAVUCONAZOL, POSACONAZOL, FEX-SULFONA E BENZNIDAZOL EM MONOTERAPIA.....	30
6.2	RECRUDESCÊNCIA DA INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> E QUANTIFICAÇÃO DO PARASITISMO.....	36
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O tratamento da doença de Chagas, realizado com benznidazol ou nifurtimox (PETRAVICIUS *et al.*, 2019), apresenta limitações relacionadas à baixa eficácia na fase crônica (CANÇADO, 2002; GUEDES *et al.*, 2011; MORILLO *et al.* 2015) e à ocorrência de reações adversas (MOLINA; MOLINA, 2018).

No intuito de encontrar novas alternativas terapêuticas, algumas moléculas identificadas como promissoras em estudos experimentais seguiram para estudos clínicos (KRATZ *et al.*, 2018). Dentre elas estão o composto nitroheterocíclico fexinidazol e os derivados azólicos posaconazol e ravuconazol (princípio ativo do pró-fármaco E1224). Enquanto os dados relacionados à avaliação clínica do fexinidazol ainda são aguardados, os resultados dos ensaios envolvendo os azólicos revelaram índices de falha terapêutica de até 90% na fase crônica assintomática com os regimes terapêuticos utilizados (MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). No entanto, ambos foram considerados seguros e bem tolerados pelos pacientes. Esses resultados evidenciaram que apesar de haver potente atividade tripanossomicida resultante da administração do posaconazol e ravuconazol (princípio ativo do E1224), a supressão do parasitismo não é sustentada após cessar o tratamento. Resposta análoga é observada em modelos experimentais *in vivo* e particularmente em modelos caninos experimentalmente infectados (DINIZ *et al.*, 2010; DINIZ *et al.* 2013; DINIZ *et al.*, 2018; GUEDES *et al.*, 2004). No entanto, ainda não se conhecem os motivos que levam à recrudescência do parasitismo após o tratamento específico (MACHADO *et al.*, 2020).

Considerando a premissa da existência de cepas naturalmente susceptíveis ou naturalmente resistentes ao benznidazol e ao nifurtimox (FILARDI E BRENER, 1987) e a indução de resistência após pressão do tratamento específico (DOS SANTOS *et al.*, 2008) alguns mecanismos para explicar esses fenótipos foram propostos baseados na genética do parasito (CAMPOS *et al.*, 2017; PETRAVICIUS *et al.*, 2019). Neste contexto, conhecer o perfil de susceptibilidade de diferentes genótipos do parasito a um determinado candidato a fármaco seria suficiente nos estudos de quimioterapia experimental anti- *T. cruzi*. No entanto, evidências têm apontado que o perfil de resistência de *T. cruzi* aos fármacos não depende exclusivamente da genética do parasito, mas envolve sua relação com o hospedeiro. Dentre elas o fato que o caráter de resistência de algumas cepas é multidrogas, as quais apresentam

diferentes mecanismos de ação (BAHIA *et al.*, 2012; BUSTAMANTE *et al.*, 2014) e pode ser variável em diferentes espécies de hospedeiros (GUEDES *et al.*, 2004; CALDAS *et al.*, 2013; CALDAS *et al.*, 2008 DINIZ *et al.*, 2010). Ainda, esse caráter pode ser alterado em função do regime terapêutico utilizado (BUSTAMANTE *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2018; MAZZETI *et al.*, 2019). Além disso, cepas resistentes ao benznidazol e azólicos *in vivo* respondem ao tratamento *in vitro* com os mesmos fármacos com valores de EC-90 em escala micro e nanomolar, respectivamente (DINIZ *et al.*, 2018; SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). Recentemente, foi comprovado o fenômeno de dormência de amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, as quais resistem por longos períodos na presença de fármacos tripanossomicidas e mantêm sua capacidade de replicação, diferenciação e potencial de infecção (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018).

Considerando todo esse contexto, e, particularmente após a falha dos estudos clínicos com os azólicos (MOLINA, 2018; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018) a discussão sobre o valor translacional dos modelos pré-clínicos *in vivo* de quimioterapia da doença de Chagas ganhou novo ímpeto (CHATELAIN e KONAR, 2015). No entanto, pouca atenção da comunidade científica tem sido dispensada para a análise dos fatores que podem interferir na seleção de candidatos a fármacos no âmbito da experimentação *in vitro*. Muito embora a influência da genética do parasito no processo de *screening* de drogas tripanossomicidas esteja sendo progressivamente explorada (MORAES *et al.*, 2014; REVOLLO *et al.*, 2019; VILLARREAL *et al.*, 2004) e já contemplada no *TPP (Target Product Profile)* para a doença de Chagas (CHATELAIN *et al.*, 2017), escassos são os estudos que abordam a influência de diferentes tipos celulares nesse contexto (FRANCO *et al.*, 2019). Em *Leishmania donovani*, um parasito do sistema fagocítico mononuclear, já foi demonstrado que a atividade leishmanicida *in vitro* de fármacos é dependente do tipo celular hospedeiro (SEIFERT *et al.*, 2010). *T. cruzi* é um parasito que infecta quaisquer células nucleadas, nas quais formas amastigotas intracelulares perpetuam a infecção e o processo patogênico e, portanto, conhecer tal influência é de grande relevância.

No presente trabalho foi estudada a resposta de diferentes tipos celulares a fármacos tripanossomicidas e desenvolvida uma estratégia experimental *in vitro* aplicável à identificação do potencial terapêutico anti- *T. cruzi* de novas moléculas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES E IMPACTO DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, considerada uma doença tropical crônica negligenciada, é endêmica na América Latina (WHO, 2020). Estima-se que 6-7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por *T. cruzi*, agente etiológico da doença, enquanto 75 milhões de pessoas estão expostas a infecção (WHO, 2020).

A parasitose afeta principalmente populações de áreas em vulnerabilidade socioeconômica, sendo a transmissão vetorial a principal forma de infecção (MOLINA; MOLINA, 2018; PETERSON *et al.* 2015). Os vetores são insetos reduvídeos hematófagos pertencentes à subfamília *Triatominae*, sendo os principais gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (SILVA, 2006), nos quais se incluem espécies altamente adaptadas ao peridomicílio ou domicílio comumente conhecidas como “barbeiros”. Por outro lado, em regiões que alcançaram o controle vetorial, a exemplo do Brasil, outras formas de transmissão assumem maior relevância epidemiológica, como a via oral (DIAS *et al.*, 2016). Ainda, essa parasitose tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos, Canadá, países europeus, africanos, mediterrâneos orientais e do Pacífico ocidental (WHO, 2020), devido à migração de pessoas para esses países vindas de regiões endêmicas (GASCON, BERN, PINAZO, 2010). A transmissão pode se dar ainda por transfusão de sangue, por via congênita, transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, dentre outros (COURA, 2007).

A forma sintomática da doença de Chagas é uma das principais causas de morbidade e perda de produtividade entre as doenças infecciosas (WHO, 2010). A infecção se apresenta em duas fases características, cuja evolução está relacionada à resposta do sistema imunológico. A fase aguda é caracterizada pela presença de tripomastigotas na corrente sanguínea e por intensa resposta imune, a qual leva ao controle do parasitismo, mas não à eliminação da infecção. Essa fase geralmente é assintomática (COURA, 2007) ou com sintomas leves, embora possa apresentar manifestações graves como miocardite ou meningoencefalite (KRATZ *et al.*, 2018). Posteriormente e na ausência de tratamento etiológico, a infecção se torna crônica (COURA *et al.* 2002), quando os parasitos são encontrados predominantemente na forma intracelular replicativa, particularmente no coração, trato digestório e tecido adiposo (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Sua evolução é altamente dependente da cepa

do parasito e resposta do hospedeiro, podendo ser assintomática ou sintomática, quando causa as manifestações clínicas cardíacas e digestivas observadas na doença (COURA, 2007; KRATZ *et al.* 2018).

Estudos feitos na América Latina indicam que 60-70% dos indivíduos infectados são assintomáticos, enquanto as cardiomiopatias severas e lesões digestivas somam 30-40% casos, geralmente aparecendo décadas após a infecção inicial (KRATZ *et al.* 2018, ZINGALES, 2011). Nas Américas, a miocardite decorrente da doença de Chagas é a forma mais comum de cardiomiopatia (BOCCHI, 2013), sendo a forma mais severa e responsável pela morbidade e mortalidade em pacientes (BONNEY *et al.* 2019).

2.2 TRATAMENTO ETIOLÓGICO

No final da década de 1960 os compostos nitroheterocíclicos benznidazol (Benznidazol, LAFEPE) e nifurtimox (Lampit®, Bayer) foram recomendados para o tratamento de pacientes agudos e crônicos da doença (URBINA; DO CAMPO, 2003). No entanto, nas décadas seguintes a administração a pacientes na fase crônica foi desaconselhada devido às evidências de que a resposta imune era responsável pelo desenvolvimento das lesões de forma independente da presença do parasito (BRENER, 1984).

Nos anos 2000 os pesquisadores tiveram evidências de que o parasito persistia e atuava na patogênese da fase crônica (VIOTTI *et al.* 2013); a partir de então diversos estudos têm mostrado que, a despeito da complexidade da doença humana, a permanência do parasito nos tecidos é o ponto chave para o desenvolvimento das lesões (VIOTTI *et al.* 2016).

Assim, o benznidazol e o nifurtimox permanecem como os únicos fármacos disponíveis para o tratamento para doença de Chagas (PETRAVICIUS *et al.*, 2019). E, embora sejam usados há décadas, provocam reações adversas importantes e não são bem tolerados pelos pacientes, estando associados à desistência do tratamento (MOLINA; MOLINA, 2018). Apesar do benznidazol ter um perfil farmacológico insatisfatório incluindo dermatopatia alérgica, síndromes gastrointestinais, púrpura e menos frequente depressão da medula óssea (RASSI *et al.* 2009), ele é melhor tolerado quando comparado ao nifurtimox, sendo o medicamento de referência no Brasil (DIAS *et al.* 2016).

O benznidazol é um pró-fármaco com atividade tripanossomicida ativado enzimaticamente por nitroredutases tipo I, classe de enzimas presente em vários protozoários parasitos (PATTERSON e WYLLIE, 2014). Administração das doses é de 5-7 mg/Kg por via oral divididas em duas ou três doses diárias para adultos e 5-10 mg/Kg para crianças até 12 anos (CHABEN, 2015), por 60 dias. O tratamento tem efeito satisfatório na fase aguda da doença (COURA; DE CASTRO, 2002). No entanto, a principal limitação na quimioterapia da doença de Chagas é a ineficácia do tratamento da fase crônica; cerca de 80% dos pacientes aos quais os medicamentos são administrados nessa fase não são curados (CANÇADO, 2002; GUEDES *et al.*, 2011; MORILLO *et al.* 2017).

Esse cenário reforça a busca por novas alternativas mais eficazes para a quimioterapia da doença de Chagas.

2.3 NOVAS ALTERNATIVAS

O número de estudos pré-clínicos com diferentes classes de moléculas candidatas ao tratamento da doença de Chagas tem se intensificado nas últimas décadas. A partir desses estudos, os fármacos mais promissores, dos quais a maioria foi identificada por meio de reposicionamento, seguiram para estudos clínicos de prova de conceito, o que representou um grande avanço na área (KRATZ *et al.*, 2018; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). Dentre eles estão o composto nitroheterocíclico fexinidazol e os derivados azólicos posaconazol e ravuconazol (KRATZ *et al.*, 2018).

O fexinidazol é um 5-nitroimidazol que foi recentemente aprovado para o tratamento oral da tripanossomíase africana (DEEKS, 2019). Este fármaco apresentou também atividade anti-*T. cruzi in vivo* (BAHIA *et al.*, 2012), a qual pode ser atribuída aos seus metabólitos sulfona e sulfóxido (BAHIA *et al.*, 2014). De forma interessante, e diferente do que é observado para a maioria dos candidatos ao tratamento da infecção por *T. cruzi*, o fexinidazol induz índices de cura da infecção experimental similares para cepas consideradas susceptíveis ou resistentes ao tratamento de referência com benznidazol (BAHIA *et al.*, 2012). Considerando esses antecedentes, está atualmente em curso um estudo clínico de prova de conceito para avaliação do fexinidazol no tratamento da doença de Chagas crônica (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03587766), após ajustes do esquema terapêutico definido a partir de um estudo

clínico realizado em 2014 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02498782). A fase de *follow-up* foi completada em 2019 e os resultados são esperados ainda para o ano de 2021 (<https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole-chagas/>).

Outros candidatos cuja eficácia no tratamento da doença crônica foi avaliada são o posaconazol e o ravuconazol. Esses fármacos, desenvolvidos originalmente como antifúngicos de uso oral, são inibidores da enzima C-14 α demetilase, interferindo na biossíntese de ergosterol de fungos e de *T. cruzi*. Os resultados dos estudos pré-clínicos demonstraram alta potência dos fármacos em estudos de atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (DINIZ *et al.*, 2018; DINIZ *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2020; URBINA *et al.*, 2003; URBINA *et al.*, 1998), gerando uma grande expectativa de eficácia no uso clínico. No entanto, os resultados dos estudos de prova de conceito para o tratamento da doença crônica mostraram que apesar do efeito tripanossomicida, ambos os fármacos foram incapazes de exercer efeito prolongado e não induziram cura parasitológica em níveis satisfatórios nos regimes terapêuticos utilizados, apesar do perfil favorável de segurança (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). Resultados similares foram observados com a utilização combinada do posaconazol ao benznidazol (MORILLO *et al.*, 2017). Já o ravuconazol ou seu pró-fármaco, E1224, não induziram cura sobre a infecção de camundongos pela cepa Colombiana de *T. cruzi* quando usados isoladamente ou em combinação com o benznidazol (DINIZ *et al.* 2018; URBINA *et al.*, 2003). Um estudo clínico que avaliou a eficácia de diferentes regimes de tratamento do benznidazol, assim como a combinação com o E1224 (BENDITA) está em fase de finalização (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03378661).

Apesar de a realização dos estudos clínicos citados representarem um avanço no campo da doença de Chagas, a definição mais assertiva de modelos experimentais pré-clínicos adequados para a predição de candidatos e estratégias de maior potencial de sucesso clínico ainda é necessária (MACHADO *et al.*, 2020).

2.4 TRYPANOSOMA CRUZI E DINÂMICA DA INFECÇÃO

A morfologia e biologia do protozoário *T. cruzi*, assim como os vetores e aspectos epidemiológicos da doença de Chagas foram descritos pelo médico e pesquisador Carlos Chagas ainda em 1909 (CHAGAS, 1909). O parasito possui

diferentes formas evolutivas no seu ciclo de vida; epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas estão presentes no vetor, enquanto as amastigotas, intracelulares, e tripomastigotas sanguíneas, extracelulares, estão presentes nos hospedeiros vertebrados.

A despeito da ativação de uma potente resposta imune pelos hospedeiros vertebrados, o protozoário mantém infecções crônicas de longa duração, parasitando diversos tipos celulares por meio de ciclos de multiplicação intracelular (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). A intensa resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro, enquanto é responsável, em última instância, pelos quadros de cardiomiopatia e megasíndromes do aparelho digestivo (DUMOULIN e BURLEIGH, 2018), não é eficaz em eliminar o parasito. Os mecanismos que explicam a persistência natural do parasito não são ainda bem compreendidos, o que dificulta a compreensão da refratariedade do parasito aos fármacos utilizados no tratamento etiológico. Muito embora o benznidazol e o nifurtimox tenham efetiva ação tripanossomicida *in vitro* e sejam hábeis em reduzir a carga parasitária do hospedeiro na vigência do tratamento não são efetivos em eliminar o parasitismo, especialmente na fase crônica da infecção (MOLINA; MOLINA, 2018; SANTOS *et al.*, 2012). Efeito similar é observado na infecção experimental com determinadas cepas do parasito, ainda na fase aguda (BUSTAMANTE *et al.*, 2014; CALDAS *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2013; DINIZ *et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2004; MAZZETI *et al.*, 2019).

O parasito apresenta diversidade genética e fenotípica e desde 2009 suas cepas são classificadas em seis *DTUs*, de acordo com marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos (ZINGALES *et al.* 2009); porém Zingales (2018) já relata que *T. cruzi* apresenta no mínimo sete *DTUs* com relações ecológicas e epidemiológicas diferentes, mas não exclusivas de cada unidade. Algumas *DTUs* foram relacionadas especificamente com manifestações cardíacas ou gastrointestinais (ZINGALES *et al.*, 2012).

Parasito intracelular obrigatório, *T. cruzi* é considerado um parasito eurixeno e capaz de invadir, se multiplicar e estabelecer a infecção em qualquer tipo celular nucleado (DURAN-REHBEIN *et al.*, 2014; FRANCO *et al.*, 2019). Ele apresenta tropismo celular diferente entre suas cepas e em relação ao tipo celular, destacando células do sistema *mononuclear* fagocítico, células nervosas e musculares (ANDRADE, 1996), além da eficiente multiplicação de amastigotas em células dendríticas (TEIXEIRA *et al.*, 2011). A capacidade invasiva e multiplicativa pode variar

ou ser regulada de acordo com a célula hospedeira, assim como o metabolismo celular (ANDRADE *et al.*, 1999; CARADONNA *et al.*, 2013). Estudos também apontam que o comportamento de formas tripomastigotas é diferente entre as cepas do parasito e entre as linhagens celulares hospedeiras, e ainda especulam que haja interação entre células infectadas e não-infectadas que influenciam na intensidade da infecção (ARIAS-DEL-ANGEL *et al.*, 2020).

Em relação à resposta à quimioterapia, Filardi e Brener (1987), descreveram os perfis de susceptibilidade/resistência de um painel de cepas de *T. cruzi* ao benznidazol e nifurtimox *in vivo*, utilizando modelo murino (FILARDI; BRENER, 1987). Tradicionalmente, o caráter de resistência ao tratamento tem sido relacionado à ampla variedade genética do parasito e dos hospedeiros (YUN *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012) e alguns estudos mostram que mutações genéticas são encontradas em clones de parasitos resistentes ao benznidazol (CAMPOS *et al.*, 2017), com destaque para genes de nitroredutases (TcNRT-1) e transportadores ABC (PETRAVICUS *et al.*, 2019). *T. cruzi* tem predomínio de propagação clonal com eventuais recombinações genéticas formando linhagens híbridas estabilizadas que posteriormente se multiplicam por propagação clonal (ZINGALES, 2011).

Mais recentemente, em particular após a falha terapêutica dos azólicos avaliados em estudos clínicos, o tema tem sido mais amplamente discutido e evidências têm apontado que o caráter de resistência é relativo e não absolutamente dependente da genética do parasito ou do hospedeiro (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). O perfil de susceptibilidade/resistência observado *in vivo* não é reproduzido *in vitro*; embora haja variabilidade nos valores de EC-50 do benznidazol para diferentes cepas de *T. cruzi* (LUNA *et al.* 2009; PETRAVICUS *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2014), a incubação do fármaco com cepas classificadas como susceptíveis ou como resistentes resulta em valores de EC-50 e EC-90 similares entre elas (DINIZ *et al.*, 2018; SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2014). Ainda, o tempo de infecção antes do início do tratamento e o regime terapêutico influenciam no desfecho do tratamento; Diniz *et al.* (2018), ao tratarem camundongos infetados com a cepa Colombiana com uma combinação de medicamentos observaram 100% de cura quando o tratamento foi instituído aos 4 dias após a infecção, enquanto não houve cura quando o mesmo tratamento foi iniciado aos 10 dias após a infecção (DINIZ *et al.*, 2018). Já Bustamante *et al.* (2014), utilizando o benznidazol em esquemas terapêuticos alternativos, mostraram diferentes índices de cura para a mesma cepa.

Esses dados mostram que o fenótipo de resistência não tem caráter estático, como seria esperado se fosse dependente da genética.

Recentemente foi descrito um possível mecanismo de resistência envolvendo as formas amastigotas do parasito. Os autores demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, a presença de parasitos intracelulares dormentes, os quais permanecem por longos períodos sem replicar. A dormência parece ocorrer de forma espontânea e transitória. Ainda, de alta relevância foi a constatação de que os parasitos dormentes resistem a prolongados períodos na presença de benznidazol (mais de 30 dias) e dão continuidade ao ciclo a partir de então, em modelos *in vitro* e murino (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). Os mecanismos pelos quais o processo de dormência se desenvolve ainda não são conhecidos; diferentes cepas do parasito apresentaram essa capacidade, no entanto, não foi investigada a influência do tipo celular hospedeiro no processo. Dados de farmacocinética pré-clínica do benznidazol em modelo murino mostram que esse fármaco apresenta biodistribuição limitada e altamente variável (PERIN *et al.*, 2020), sugerindo que as concentrações e o tempo de permanência nos diferentes tecidos podem não ser suficientes para a completa eliminação do parasito. Esses dados reforçam a hipótese de que a falha terapêutica relacionada ao benznidazol pode residir no fato de o fármaco não atingir os tipos celulares parasitados, em concentrações adequadas e por tempo suficiente para eliminar o parasito.

Diante do exposto, conhecer o perfil de atividade *in vitro* do benznidazol, fex-sulfona, ravuconazol e posaconazol em diferentes tipos celulares infectados e ainda investigar a eficácia dos fármacos em eliminar ou apenas suprimir o parasitismo é de grande relevância. Porém, é escassa a literatura relacionada ao tema (FRANCO *et al.*, 2019).

3 JUSTIFICATIVA

A falha terapêutica observada para todos os compostos até agora avaliados no tratamento da doença de Chagas crônica reforça a necessidade urgente de buscar, além de novas moléculas promissoras, estratégias de avaliação pré-clínica que permitam alcançar maior previsibilidade para os ensaios subsequentes. Vários estudos nas últimas décadas foram realizados a fim de compreender o perfil farmacológico das drogas utilizadas na quimioterapia da doença de Chagas; estratégias alternativas como o reposicionamento e a combinação de fármacos também têm sido extensivamente avaliadas (MACHADO *et al.*, 2020). No entanto, apesar de os estudos *in vitro* serem a base para essas avaliações, têm sido escassamente discutidos, particularmente no que diz respeito à influência do tipo celular hospedeiro na resposta aos fármacos. *T. cruzi* parasita qualquer tipo celular nucleado e evidências mostram que a dinâmica da infecção é influenciada pelo tipo celular hospedeiro (ARIAS-DEL-ANGEL *et al.*, 2020). Por outro lado, a afinidade do benznidazol é variável para diferentes tecidos (PERIN *et al.*, 2017). E, curiosamente esses aspectos usualmente não são considerados no *screening* de fármacos tripanossomicidas *in vitro*. Adicionalmente, apesar de permitirem a identificação da atividade anti- *T. cruzi* dos fármacos, os protocolos utilizados nessas análises não permitem mimetizar as condições que ocorrem *in vivo*, particularmente relacionadas ao processo de supressão e recrudescência do parasitismo (CAL *et al.*, 2016).

Essas limitações, somadas à grande heterogeneidade biológica do parasito, podem contribuir para o reduzido valor translacional observado para as avaliações *in vitro* no âmbito da quimioterapia anti- *T. cruzi*. Nesse sentido, explorar, por meio da utilização de fármacos com reconhecida ação tripanossomicida, aspectos da interação patógeno-hospedeiro-fármaco e metodologias alternativas que permitam identificar de forma mais assertiva de candidatos a fármacos de alto potencial terapêutico é essencial.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto dos tipos celulares hospedeiros Vero e H9c2 na atividade anti- *T. cruzi* de fármacos e desenvolver uma estratégia que permita avaliar supressão e recrudescência do parasitismo pós-tratamento *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar comparativamente os valores de EC-50 e EC-90 dos fármacos benznidazol, fex-sulfona, posaconazol e ravuconazol sobre a infecção de células Vero e H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*;
- Padronizar uma metodologia para avaliação *in vitro* da recrudescência do parasitismo após o tratamento etiológico;
- Identificar a influência do mecanismo de ação do fármaco e tipo celular hospedeiro no padrão de recrudescência do parasitismo nos diferentes tipos celulares.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CEPA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Foi utilizada a cepa Y de *T.cruzi* (DTU II) (ZINGALES *et al.* 2009) considerada parcialmente resistente ao benznidazol e ao nifurtimox (FILARDI; BRENER, 1987), com alta virulência e amplamente utilizada nos estudos de quimioterapia anti- *T.cruzi*. (DURAN-REHBEIN *et al.*, 2014). A cepa é mantida no laboratório através de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos e criopreservação.

5.2 FÁRMACOS E REAGENTES

Tabela 1- Fármacos e reagentes

Benznidazol	2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitro-1imidazoleacetamide), Lafepe, usado como fármaco de referência
Metabólito fex-sulfona	1-metil-2 - [(4-metilsulfonilfenoxi) metil] -5-nitroimidazol
Ravuconazol	([R-(R*, R*)] -4-[2-[2-(2,4-difluorophenyl) -2-hydroxy-1-methyl-3- (1H-1,2,4-triazol-1-yl) propyl] -4-thiazolyl] benzonitrile)
Posaconazol	4- [4- [4- [4 - [[(3R, 5R) -5- (2,4-difluorofenil) -5- (1,2,4-triazol-1-ilmetil) oxolan-3 -il] metoxi] fenil] piperazin-1-il] fenil] -2 - [(2S, 3S) -2-hidroxipentan-3-il] -1,2,4-triazol-3-ona
Alopurinol	1,5-di-hidropirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona

Fonte: autor

5.3 CÉLULAS DE MAMÍFEROS

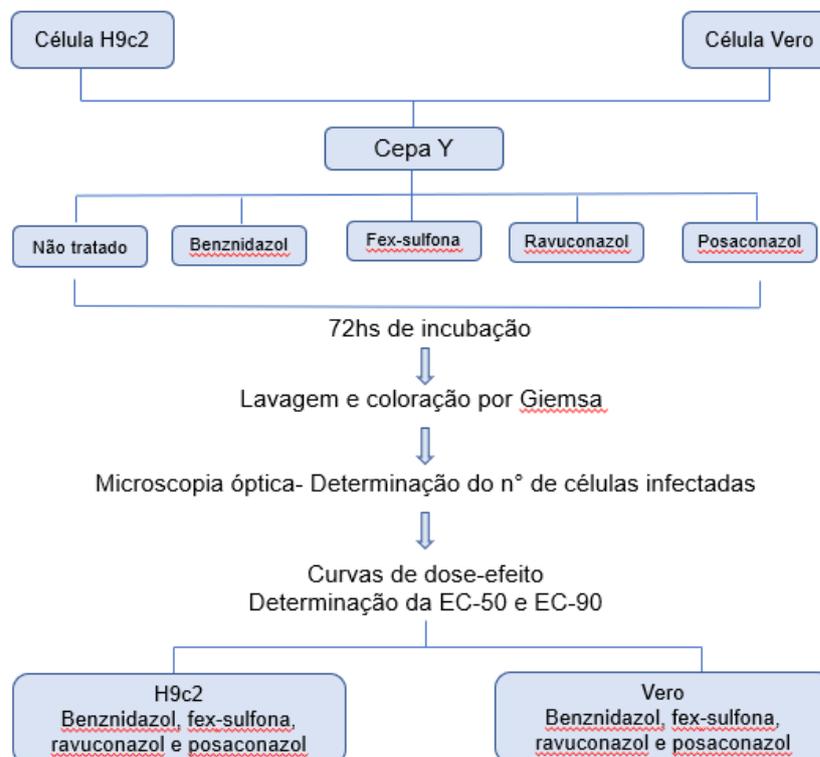
Foram utilizadas duas linhagens celulares; H9c2, derivada de tecido cardíaco células de ratos BD1X que apresentam propriedades do músculo esquelético (KIMES e BRANDT, 1976) e linhagem Vero, derivada de células epiteliais de rim de macaco verde adulto africano (YASUMURA e KAWAKITA, 1963). Foram cultivadas monocamadas celulares e mantidas em Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) e 100 ug/ mL de penicilina, sob uma

atmosfera de 5% de Co₂ a 37°C. O sub-cultivo de ambas linhagens foi realizado ao atingirem semi-confluência. As células H9c2 (American Type Culture Collection (ATCC): CRL-1446) foram suplementadas com 10% de SFB, enquanto as células Vero (ATCC: CCL 81) com 5% de SFB (MORAES, DINIZ, BAHIA, 2015).

5.4 ENSAIOS *IN VITRO*

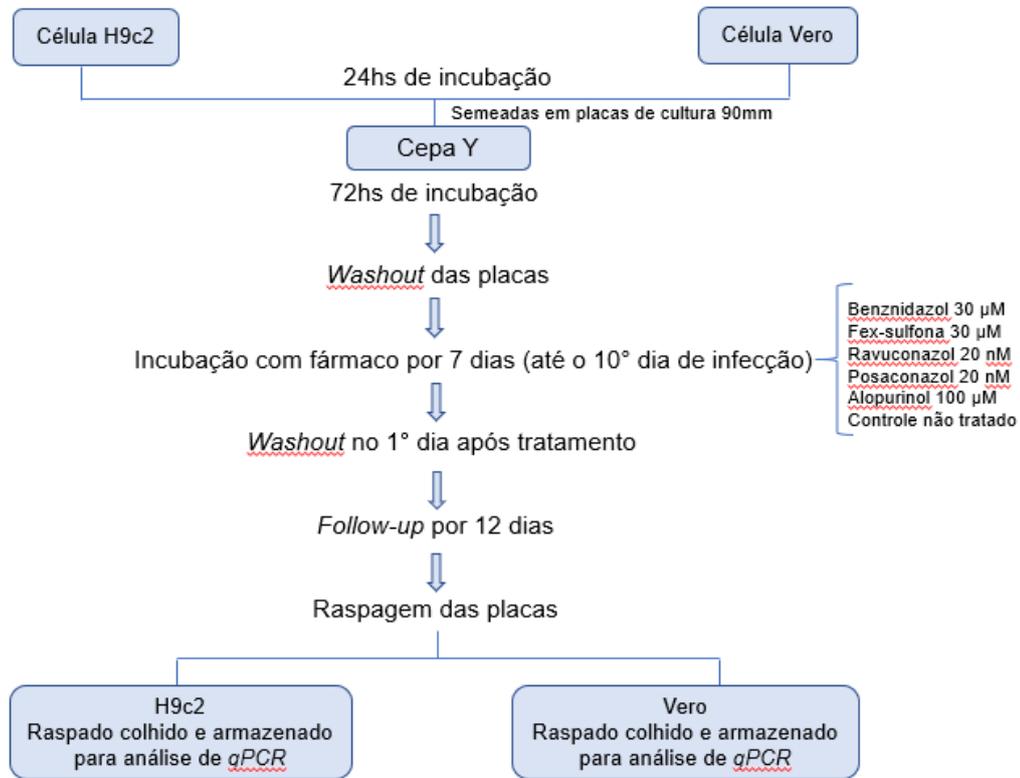
Foram realizadas duas estratégias experimentais distintas utilizando as mesmas linhagens, cepa do parasito e fármacos, com os objetivos de comparar a resposta dos diferentes tipos celulares aos fármacos tripanossomicidas em curto prazo (Figura 1) e posteriormente padronizar uma estratégia de detecção da recrudescência do parasitismo pós-tratamento aplicável *in vitro* aplicável a avaliação do potencial tripanossomicida de novas moléculas (Figura 2).

Figura 1- Delineamento experimental do ensaio para determinação das concentrações de EC-50 e 90 dos fármacos benznidazol, fex-sulfona, ravuconazol e posaconazol.



Fonte: autor

Figura 2- Delineamento experimental do ensaio em placas de Petri para verificação da supressão e recrudescência do parasitismo *in vitro*.



Fonte: autor

5.4.1 Obtenção do parasito

A forma infectante tripomastigota da cepa Y foi obtida após a infecção das culturas celulares (H9c2) com tripomastigotas sanguíneos de camundongos no pico de parasitemia. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, o meio das culturas foi removido para descartar os parasitos não internalizados, as células foram lavadas três vezes com meio DMEM e então foi adicionado meio fresco. Após 72h de incubação nas mesmas condições, as formas tripomastigotas liberadas foram colhidas do sobrenadante dessas culturas e centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos para separação dos debris celulares. O sobrenadante rico em tripomastigotas foi então centrifugado a 3500rpm a 4°C por 15 minutos. Os parasitos presentes no pellet foram ressuspensos em meio fresco e quantificados em câmara de Neubauer para a posterior utilização (DINIZ *et al.*, 2018).

5.4.2 Determinação do EC-50 e EC-90 dos fármacos nos diferentes tipos celulares infectados pela cepa Y de *T. cruzi*

Para determinação do EC-50 e EC-90 dos fármacos foram plaqueadas 1×10^3 células de H9c2 e Vero em lamínulas de vidro (13mm) em placas de 24 poços. Após 24 horas as células foram incubadas, a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, com formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* na proporção de 20 parasitos para cada célula hospedeira. Passadas 24 horas de interação as lamínulas foram lavadas com meio DMEM para retirada dos parasitos não internalizados e adicionado meio fresco. Então foram incubadas com os fármacos em concentrações crescentes por 72 horas. Os fármacos utilizados foram benznidazol (8 diluições 1:2 a partir de 60µM), fex-sulfona (8 diluições a partir de 80µM), ravuconazol (7 diluições 1:2 a partir de 10 nM) e posaconazol (7 diluições 1:2 a partir de 8 nM). As concentrações foram escolhidas a partir de dados disponíveis na literatura (BAHIA *et al.*, 2014; URBINA *et al.*, 1998; URBINA *et al.* 2003). Ao final as lamínulas foram lavadas em PBS, fixadas com metanol por 5 minutos e coradas pelo Giemsa (10% v/v). Após secagem, as lamínulas foram fixadas em lâminas de vidro com Entellan e submetidas à análise em microscopia óptica. Foi determinado o percentual de infecção em células infectadas e incubadas ou não com cada uma das concentrações dos fármacos. Para as lamínulas contendo H9c2 foram analisadas 200 células, enquanto as contendo células Vero, 500 células. Foi então calculado o percentual de inibição da infecção pelos fármacos comparativamente aos controles por meio da fórmula:

$$\% \text{inibição} = 100 - (\% \text{ infecção tratado} / \% \text{ infecção controle}) \times 100$$

Os valores de percentual de inibição foram utilizados para construção das curvas de dose-efeito no *software Graphpad Prism*) e para determinação dos valores de EC-50 e EC-90 no *software CompuSyn*. Todos os experimentos foram realizados em duplicata com no mínimo duas repetições.

5.4.3 Ensaio *in vitro* em placas

5.4.3.1 Infecção e tratamento

Foram utilizadas placas de Petri de 90mm de diâmetro (Kasvi) para permitir o acompanhamento das culturas por longo prazo. Após experimentos preliminares para padronização do número de células, foram semeadas 5×10^4 células da linhagem H9c2 e $3,75 \times 10^4$ da linhagem Vero em cada placa, usando meio de cultura suplementado com 10% e 5% de SFB, respectivamente. Após 24 horas as células foram infectadas pela cepa Y na proporção de 20 parasitos: célula hospedeira usando tripomastigotas derivados de cultura celular; seguidas 24h de infecção as placas foram lavadas com meio fresco para retirada dos parasitos não internalizados e ao total de 72h pós-infecção foi realizada a incubação com os fármacos. Após nova lavagem das placas com meio fresco foram adicionados em cada placa $30 \mu\text{M}$ de benznidazol e fex-sulfona; 20nM de ravuconazol e posaconazol; $100 \mu\text{M}$ de alopurinol e uma placa como controle positivo sem tratamento. A suplementação com SFB foi reduzida para 5% em H9c2 e 1% para células Vero. O período de incubação com os fármacos somou sete dias, no entanto, no 4º dia o meio foi trocado por meio fresco adicionado do fármaco. As concentrações foram determinadas a partir dos resultados do experimento para determinação de EC-50 e EC-90 e dados da literatura (MACHADO *et al.*, 2020). Células infectadas e na ausência de incubação com os fármacos foram mantidas como controle.

5.4.3.2 Follow-up

A estratégia de *washout* foi utilizada para permitir o acompanhamento da recrudescência do parasitismo. No 11º dia de incubação (correspondente ao final do 7º dia de incubação com os fármacos e 10º dia de infecção) o meio com fármaco foi retirado e adicionado meio fresco. A partir daí, as placas foram acompanhadas diariamente por microscopia óptica até o 12º dia pós-tratamento. Para tanto, as placas eram visualizadas no microscópio invertido para identificação das formas amastigota e/ou tripomastigotas. No último dia de observação metade do meio foi retirado e metade da placa foi removida com raspador de células estéril e, em seguida, o restante do meio foi colhido e armazenado em criotubo a -20° para posterior determinação de carga parasitária pela técnica de *qPCR* (*Taqman*). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

5.4.3.3 Quantificação da carga parasitária pós-follow up

As análises de *qPCR* foram realizadas em colaboração com o Dr. Sérgio Caldas, do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-BH).

5.4.3.3.1 Extração de DNA genômico de culturas celulares infectadas ou não por *T. cruzi*

Para cada amostra, 200 µL de sobrenadante de raspado de cultura celular foram submetidas à extração de DNA genômico com o kit ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System (Promega), conforme procedimentos descritos abaixo, adaptados para a extração de DNA de cultura celular. Assim, sobre cada amostra foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL), seguido de homogeneização por cerca de 10 segundos em agitador de tubos. Posteriormente, 200 µL de tampão de lise celular foram adicionados às amostras, procedendo-se nova homogeneização e incubação a 56° C, por 20 minutos. Decorrido o tempo de incubação, 250 µL de tampão de ligação foram adicionados em cada amostra, a qual foi homogeneizada novamente por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas em temperatura ambiente (T.A.) por 1 minuto a 16.100 x g, sendo o sobrenadante transferido para colunas de ligação (ReliaPrep), previamente identificadas e posicionadas em tubos coletores, os quais foram centrifugados nas mesmas condições anteriores, seguido do descarte do tubo coletor contendo o filtrado e substituição por novos tubos coletores. Em seguida foram realizadas três lavagens das colunas, utilizando-se 500 µL de solução de lavagem e centrifugação (16.100 x g, 3 min., T.A.). Finalmente, os tubos coletores foram substituídos por microtubos estéreis, sendo o DNA eluído em 200 µL de água livre de nucleases após centrifugação (16.100 x g, 1 min., T.A.). Os DNA obtidos foram armazenados a -20° C, até serem requeridos para a PCR em tempo real quantitativa (*qPCR*).

5.4.3.3.2 Padronização de estratégia de quantificação de DNA pelo método do Ct comparativo

Uma curva padrão foi gerada a partir de concentração conhecida de DNA proveniente de formas epimastigotas da Cepa Y do *T. cruzi* submetidas a 8 diluições seriadas (1:10) em pool de DNA genômico (1:1) extraído de culturas de células VERO e células H9C2 não infectadas. Assim, o limite de quantificação e eficiência de amplificação da *qPCR* foram determinados por meio de curva padrão gerada a partir da diluição de 2×10^4 parasitos-equivalentes/ μL em DNA extraído do pool de cultura de células provenientes de 200 μL do mix de sobrenadante celular (1:1) de células VERO e H9C2. A estratégia de quantificação utilizada foi baseada em um método Ct comparativo (ΔCt) seguido da conversão dos dados de quantificação relativa para dados de parasito-equivalente/ μL de reação conforme a fórmula seguinte:

$(1 + n) - (\Delta\text{Ct} + \Delta\text{CtSd})$, onde n corresponde à eficiência de amplificação do DNA do parasito (p), equivalendo a 1 para eficiência de 100%, Ct (Cycle threshold) é a interseção entre a curva de amplificação e a linha threshold; r = amostra padrão de referência com concentração (p) conhecida, $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct Pmédia} - \text{Ct Rmédia})$; $\Delta\text{CtSd} = \sqrt{(\text{Sd}^2 p + \text{Sd}^2 r)}$ and $\text{Sd} = \text{Standard deviation}$.

5.4.3.3.3 PCR em tempo real quantitativa

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2 μL de DNA genômico, 0,35 μM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o DNA satélite do *T. cruzi*, (CzFw 5`-CCACCATTCATAATTGGAAACAAA-3` e CzRv 5`-CTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3, o qual amplifica um produto de 76 pb), 0,15 μM de sonda oligonucleotídica para o *T. cruzi* (5' FAM-ACCACAACGTGTGATGC-3'MGB-NFQ), 5 μL de 2x TaqMan® Universal Master Mix II, e água suficiente para um volume final de 10 μL por reação.

As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™), centrifugadas por 2 minutos a 200g e levadas ao termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems). O programa de termociclagem consistiu de aquecimento a 95o C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95o C por 15 segundos e 60o C por 1 minuto. Cada placa continha um controle negativo da extração e um controle negativo da PCR, em duplicata, com água no lugar de amostra. As eficiências de amplificação foram determinadas automaticamente pelo software 7500 v2.3 através da fórmula: Eficiência (E) = $10(-1/\text{slope}) - 1$, onde slope corresponde à inclinação da curva padrão (STORDEUR *et al.*, 2002).

5. 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de AUC e PCR foram apresentados como média \pm SD. Comparações entre os diferentes tipos celulares foram feitos por teste T utilizando o *software Graphpad Prism 7.0*. A diferença foi considerada significativa se $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA DO RAVUCONAZOL, POSACONAZOL, FEX-SULFONA E BENZNIDAZOL EM MONOTERAPIA

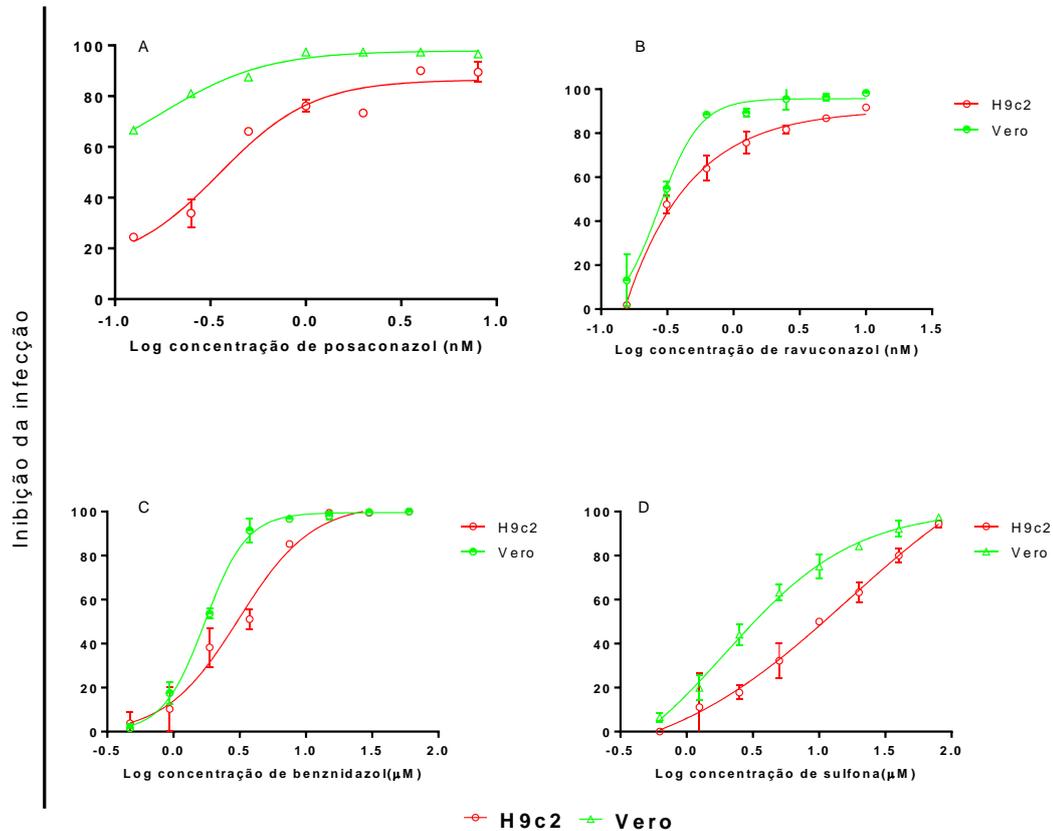
Inicialmente foram determinados os valores de EC-50 e EC-90 do benznidazol, fex-sulfona, ravuconazol e posaconazol sobre infecção das linhagens celulares H9c2 e Vero pela cepa Y de *T. cruzi*. Os percentuais de infecção encontrados foram respectivamente 50% e 40% para H9c2 e Vero. A escolha desses fármacos foi baseada na literatura; enquanto o benznidazol é o fármaco de referência, os demais foram os candidatos que chegaram aos estágios mais avançados de avaliação pré-clínica e clínica nos estudos de quimioterapia a doença de Chagas. Além disso, pertencem a classes farmacológicas que apresentam diferentes mecanismos de ação; os azólicos inibem a biossíntese de ergosterol (Urbina *et al.*, 2003), enquanto os nitroimidazólicos benznidazol e fex-sulfona atuam via stress redutivo e levam à degradação de macromoléculas (BAHIA *et al.*, 2012).

A Figura 1 mostra as curvas de dose-resposta dos diferentes fármacos sobre a infecção pela cepa Y de *T. cruzi* nos diferentes tipos celulares. Foi observado que independente da classe e mecanismo de ação dos fármacos os efeitos foram de concentração-dependente. As curvas referentes aos fármacos azólicos (Figura 1A e 1B) demonstraram a potente ação sobre a infecção em escalas nanomolar e subnanomolar, confirmando estudos anteriores (MACHADO *et al.*, 2020; URBINA *et al.*, 1998; URBINA *et al.*, 2003). No entanto, o posaconazol induziu percentuais de inibição superiores comparado ao ravuconazol, especialmente em células Vero (Figura 1A e 1B).

Já para os compostos nitroheterocíclicos (Figura 1C e 1D) foi observada ação tripanossomicida em escala de micromolar, confirmando dados da literatura (BAHIA *et al.*, 2014; MORAES *et al.* 2014).

De forma geral, os perfis das curvas de dose-efeito obtidas sugerem que quando utilizadas as células Vero os percentuais de inibição para os diferentes fármacos foram maiores se comparados às mesmas concentrações usadas nas células H9c2, principalmente para percentuais de inibição menores que 80%, sugerindo que esse tipo celular seria mais susceptível à ação dos fármacos (Figura 3).

Figura 3- Curva de dose-efeito da atividade tripanossomicida do posaconazol, ravuconazol, fex-sulfona e benznidazol sobre a cepa Y.

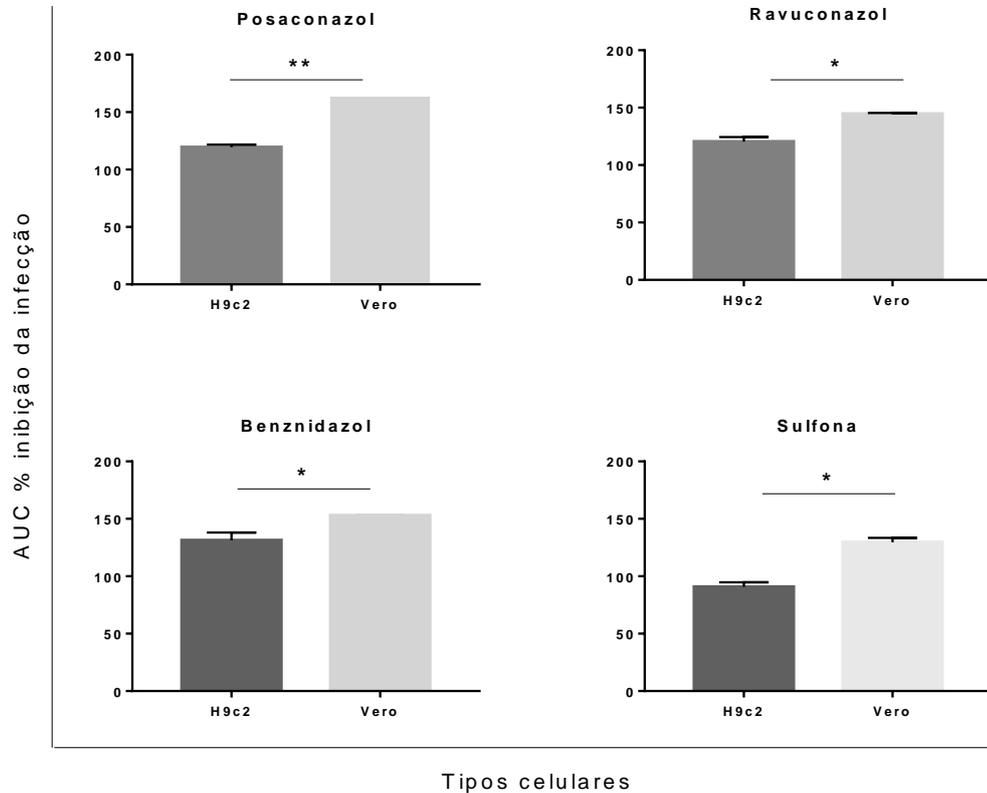


Fonte: autor

Nota: Células H9c2 ou Vero foram incubadas por 24 horas com tripomastigotas derivados de tecido da cepa Y de *T. cruzi*. Após lavagem, foram incubadas por 72 horas com concentrações crescentes dos fármacos. O percentual de inibição foi obtido a partir da divisão do percentual de infecção observado nas células tratadas pela média observada nos poços não tratados $\times 100$. As curvas de dose-efeito foram construídas no software *Graphpad Prism 5.0*.

Para permitir a comparação de forma mais objetiva dos dados obtidos para os diferentes tipos celulares, foi mensurada a área sob a curva de inibição para os diferentes fármacos comparativamente entre os tipos celulares. A figura 4 mostra que a inibição do parasitismo foi significativamente maior quando utilizadas células Vero, independente do fármaco, apesar de a diferença ter sido mais pronunciada para o posaconazol ($p=0,0016$).

Figura 4- Área sob a curva de inibição resultante de diversos fármacos sobre a infecção de células H9c2 e vero pela cepa Y de *T. cruzi*.



Fonte: autor

A seguir foram determinados os valores de EC-50 e EC-90 para cada fármaco nos diferentes tipos celulares (Tabela 2). Em acordo com o que foi observado nos percentuais de inibição, os valores de EC-50 dos fármacos considerando a linhagem Vero foram no mínimo duas vezes menores quando comparado aos encontrados em H9c2, sugerindo que esse tipo celular seja mais susceptível aos fármacos. De forma interessante, o valor de EC-50 do posaconazol foi quase quatro vezes menor quando considerada a linhagem H9c2 (Tabela 2). Já com relação à EC-90, as diferenças foram mais sutis para fex-sulfona e ravuconazol, enquanto os valores para posaconazol e benznidazol foram no mínimo 2,5 vezes maiores para as células H9c2 (Tabela 2 e Figura 5).

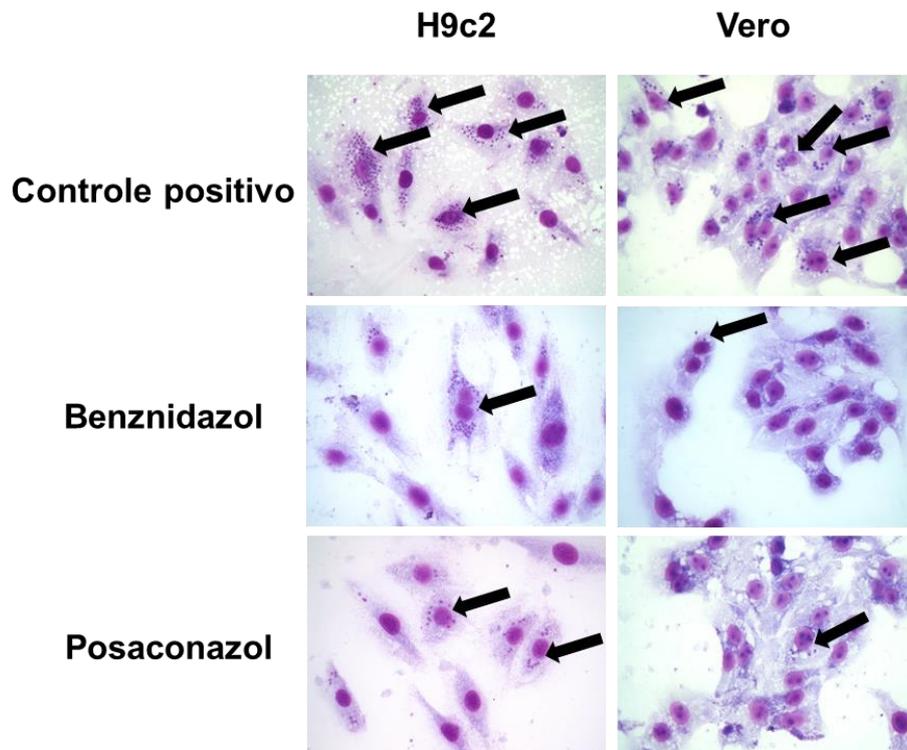
Tabela 2- Influência do tipo celular hospedeiro na atividade tripanossomicida de fármacos com diferentes mecanismos de ação.

Fármacos	EC-50		EC-90	
	Tipo celular		Tipo celular	
	Vero	H9c2	Vero	H9c2
Posaconazol nM	0,093±0,067	0,355±0,075	1,23±0,6	4,14±1,1
Ravuconazol nM	0,25±0,02	0,66±0,165	3,31±1,21	5,11±0,24
Fex-sulfona uM	4,92±1,47	10,96±1,35	54±0,26	69,6±0,5
Benznidazol uM	1,55±1,12	4,23±0,77	8,56±3,45	21,78±0,22

Fonte: autor

Valores de EC-50 e EC-90 representados pela média±SD de no mínimo dois experimentos independentes. Cálculos foram feitos utilizando *software CompuSyn*.

Figura 5- Fotomicrografias representativas de células H9c2 e vero infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* incubadas ou não com os fármacos benznidazol (3,75µM) e posaconazol (0,125µM).



Imagens foram obtidas na objetiva de 40x. Setas indicam células infectadas com formas amastigotas de *T.cruzi*.

Fonte: autor

T. cruzi é um parasito que infecta diversos tipos celulares, de forma a possibilitar grande diversidade de modelos celulares e condições experimentais que possibilitam aumento da compreensão sobre os mecanismos de interação parasito-hospedeiro. Por outro lado, essa diversidade grande variedade de protocolos que dificultam a comparação de dados entre os grupos de pesquisa (DURAN-REHBEIN *et al.* 2014). A literatura traz poucos dados sobre qual modelo experimental, especialmente *in vitro*, teria maior valor preditivo nas avaliações de novas moléculas no âmbito da quimioterapia da doença de Chagas. Ainda, não há metodologia padronizada *in vitro* e *in vivo*, assim como protocolos de avaliação a fim de diminuir a variabilidade e melhorar a previsibilidade de fármacos candidatos (CHATELAIN e KONAR, 2015).

Nos últimos anos alguns estudos para estabelecerem protocolos a serem adotados na triagem de novos fármacos foram realizados. Romanha *et al.* (2010) sugeriram utilização das linhagens Vero, HeLa, L929 e L6 para *screening* de novas drogas tripanossomicidas. Essa recomendação foi feita porque esses tipos celulares, além de serem linhagens já bem estabelecidas, possibilitam a automação nos procedimentos de quantificação do parasitismo, desde que infectados por parasitos transfectados com proteínas fluorescentes (ROMANHA *et al.*, 2010). Os autores propuseram ainda pontos de corte no fluxo de *screening* baseados no valor de EC-50 do benznidazol, o qual assumiram ser 3,8 μ M. Duran-Rehbein *et al.* (2014), em revisão sobre modelos de infecção por *T. cruzi in vitro* identificaram que as linhagens Vero e HeLa como os tipos celulares mais utilizado, no entanto não foram discutidos valores de EC-50. Em recente revisão da literatura sobre o tema, Bonilha *et al* (em publicação) identificaram que a faixa de valores de EC-50 do benznidazol sobre formas intracelulares em estudos *in vitro* varia de 3,73 μ M a 48,4 μ M, a depender do tipo de célula hospedeira, cepa do parasito, tempo de infecção, tempo de incubação com os fármacos e técnica de quantificação utilizada. De fato, no presente estudo foram encontrados valores médios de EC-50 de 4,92 a 10,96 μ M para fex-sulfona e de 1,55 a 4,23 μ M para benznidazol, a depender do tipo celular; Bahia *et al* (2014) identificaram para os mesmos fármacos 5,8 μ M e 6,9 μ M, respectivamente, utilizando macrófagos peritoneais.

Franco *et al.* (2019) exploraram, por meio de triagem de alto conteúdo de uma quimioteca comercial, diferentes linhagens hospedeiras (Vero e U2O2) e cepas do parasito. Os autores observaram que a susceptibilidade ao benznidazol variou em

função da cepa do parasito e da célula hospedeira (Franco et al., 2019). No entanto, não foram incluídas células alvo do parasito.

Assumindo que alguns tipos celulares podem ser mais ou menos susceptíveis tanto a infecção (ARIAS-DEL-ANGEL *et al.*, 2020) quanto à ação dos fármacos (Perin *et al.*, 2020; Franco *et al.*, 2019), a identificação de modelos que representem o tropismo do parasito e reflitam com maior valor preditivo o comportamento *in vivo* são essenciais. O tropismo por células musculares, nervosas e do sistema endotelial sugerem que algumas linhagens sejam utilizadas (ROMANHA *et al.*, 2010; DURAN-REHBEIN *et al.*, 2014).

Cardiomiócitos da linhagem H9c2 são muito usados em experimentação *in vitro* devido aos seus parâmetros morfológicos serem semelhantes a cardiomiócitos embrionários imaturos (LOUCH; S HEEHAN; WOLSKA, 2011; WATKINS; BORTHWICK; ARTHUR, 2011), possibilitando análises de cardiocitotoxicidade de novas drogas (WITEK *et al.*, 2016). É um tipo celular interessante para estudos de quimioterapia anti- *T. cruzi* *in vitro* por ser uma célula alvo do parasito. No entanto essa linhagem ainda é pouco utilizada neste contexto. Nossos resultados indicam que as células H9c2 são um bom modelo para estudos de atividade anti-*T. cruzi*, apresentando maior estringência do que as células Vero, visto que, de forma geral, os valores de EC-50 e EC-90 foram maiores para o cardiomiócito.

Muito embora os valores de EC-50 e EC-90 sobre formas amastigotas intracelulares sejam importantes parâmetros para *screening* de potenciais *hits* anti- *T. cruzi*, eles são definidos a partir de experimentos de curta duração, em geral 24 a 96 horas de incubação com o fármaco, mimetizando um ciclo de multiplicação do parasito, classicamente considerado como 96 horas (Bonilha *et al.* em publicação). Nesse sentido, a maior parte dos dados disponíveis na literatura acerca do medicamento de referência refletem esses protocolos. Por outro lado, a faixa terapêutica do benznidazol utilizada para fins de estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos, é de 3 a 6 mg/L (11,5 a 23 μ M), concentração essa estabelecida em 1979 por Raaflaub e Ziegler (1979). Considerando o tempo curto tempo de avaliação *in vitro*, e ainda que a maior parte das avaliações *in vitro* utiliza como parâmetro valores de EC-50 (e não EC-90 ou EC-99), não é possível identificar se os valores observados experimentalmente *in vitro* estão efetivamente compreendidos dentro desta faixa terapêutica teórica.

Todos os aspectos comentados podem colaborar para o baixo valor translacional dos modelos de avaliação *in vitro* na quimioterapia anti- *T. cruzi*. Em geral, fármacos que apresentam eficácia na infecção *in vivo* usualmente apresentam atividade sobre as formas amastigotas *in vitro*. No entanto, a capacidade de matar o parasito não significa que haverá atividade antiparasitária sustentada; de fato a grande limitação da quimioterapia da doença de Chagas não tem sido encontrar moléculas tripanossomicidas, mas sim fazer com o que efeito de supressão transitória do parasitismo se torne supressão sustentada até que o parasito seja eliminado. Na tentativa de identificar um protocolo de triagem *in vitro* que refletisse esses aspectos, foi realizada a segunda etapa do trabalho: padronização de uma metodologia para acompanhamento da supressão e recrudescência do parasitismo usando altas concentrações dos fármacos.

6.2 RECRUDESCÊNCIA DA INFECÇÃO *IN VITRO* E QUANTIFICAÇÃO DO PARASITISMO

Com o objetivo de desenvolver uma estratégia que permita analisar se a atividade anti-*T.cruzi* de um candidato é sustentada, a qual pode ser aplicada anteriormente à progressão para experimentação *in vivo*, foi realizado um experimento em placas de 90mm de diâmetro de forma a fornecer a possibilidade de acompanhamento da cultura a longo prazo e, portanto, identificar supressão e recrudescência do parasitismo à semelhança do que é feito em protocolos de curto prazo *in vivo* (MACHADO *et al.* 2020; MAZZETI *et al.*, 2018). Para desenvolvimento da estratégia, as células foram cultivadas em placas de 90mm com o objetivo de permitir o tratamento (por 7 dias) de células com infecção bem estabelecida (72 horas de infecção) e acompanhamento por longo prazo (mais de 30 dias). Após 7 dias o fármaco era retirado da cultura (*washout*), que era acompanhada diariamente por microscopia. Considerando que o objetivo era observar a capacidade de supressão/ eliminação do parasitismo, foram utilizadas concentrações dos fármacos superiores ao valor de EC-90 (exceto para fex-sulfona, cuja concentração foi mantida em 30µM para fins de comparação com o benznidazol) considerando os resultados da tabela 2 e dados da literatura (BAHIA *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2014). A supressão do parasitismo foi identificada pela microscopia óptica, enquanto a observação da recrudescência da infecção foi realizada de acordo com: (i) visualização em

microscopia óptica de formas amastigotas e/ou tripomastigotas e (ii) determinação da carga parasitária por *qPCR*. No decorrer do acompanhamento foi possível visualizar ambas as formas evolutivas em diferentes tempos, a depender do tipo celular e do fármaco. A tabela 3 resume os dados observados para as células tratadas ou não com os diferentes fármacos.

Tabela 3- Supressão, recrudescência e quantificação do parasitismo de células H9c2 e Vero infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* e incubadas com fármacos que apresentam diferentes mecanismos de ação.

Fármacos/ Tipos celulares	Número de dias para recrudescência da infecção e intensidade do parasitismo ^a											
	Vero						H9c2					
	Exp1			Exp2			Exp1			Exp2		
	Ama ^b	Tripo ^c	PCR ^d	Ama	Tripo	PCR	Ama	Tripo	PCR	Ama	Tripo	PCR
Controle*	*	*	14123,8	*	*	4537,9	*	*	***	*	*	***
Benznidazol (30 µM)	5	5	28,8	9	9	1,5	3	3	289,4	4	6	86,1
Fex-sulfona (30 µM)	9	9	2,33	10	11	0,19	7	7	177,1	4	6	38,5
Posaconazol (20 nM)	**	**	0,53	**	**	0,23	**	**	1,920	**	**	0,69
Ravuconazol (20 nM)	**	**	0,27	**	**	0,05	**	**	0,832	**	**	0,57
Alopurinol (100µM)	4	1	27,172	NR	NR	NR	4	1	650,3	NR	NR	NR

Fonte: autor

^a A recrudescência do parasitismo foi investigada por microscopia óptica por contraste de fase diariamente durante todo o período de avaliação (até 12 dias após a remoção dos fármacos); e por qPCR no 12^o dia após a remoção dos fármacos; ^b Ama – Detecção de amastigotas por microscopia óptica de contraste de fase Resultados expressos em número de dias para identificação (intensidade do parasitismo); ^c Tripo – Detecção de tripomastigotas por microscopia óptica de contraste de fase – Número de dias para identificação (intensidade do parasitismo); ^dPCR- Carga parasitária (parasito-equivalente) determinada por PCR em tempo real. Exp- experimento. * Controle- Detecção de amastigotas e tripomastigotas por microscopia óptica no primeiro dia de investigação. ** Não foi visualizada recrudescência da infecção por microscopia ótica. *** Não possui dados devido exaustão celular causada pela infecção anterior ao término. NR- não realizado.

As placas mantidas sem incubação com fármaco apresentaram grande quantidade de formas tripomastigotas e amastigotas no decorrer dos primeiros dias, seguindo curso natural de infecção, e a exaustão celular ocorreu em média com dezesseis dias de infecção. Durante os sete dias de tratamento foi realizada uma troca de meio, como reposição do fármaco e não foram visualizadas formas de *T. cruzi*. O tempo de tratamento de sete dias foi escolhido baseado em estudos de Diniz *et al.* (2013) que utilizaram diferentes regimes de tratamento *in vivo* para diferenciar a atividade dos compostos em períodos curtos de tempo; e Mazzeti *et al.* (2018) que confirmaram a recrudescência do parasitismo em camundongos em média de 15-17 dias pós-tratamento para tratamento de 7-10 dias com benznidazol. Esses resultados nos levaram investigar a recrudescência do mesmo período de tratamento *in vitro*.

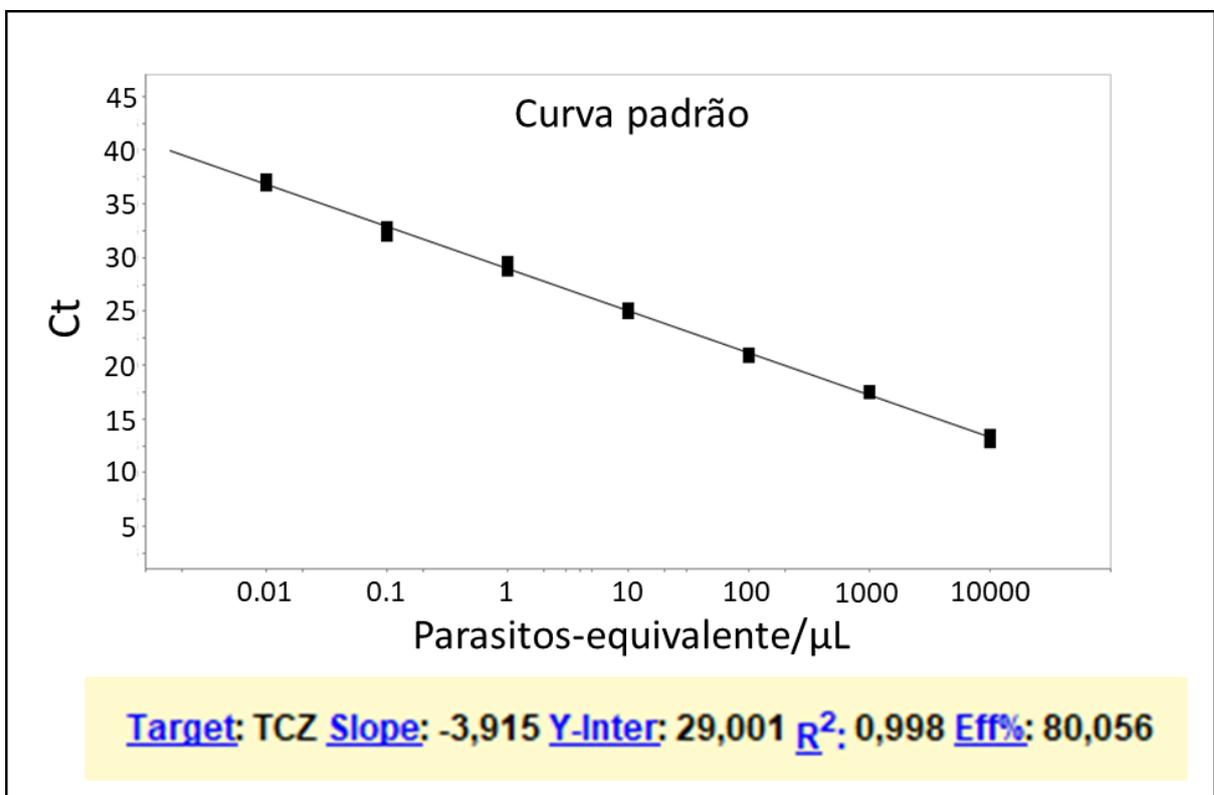
As células H9c2 tratadas com benznidazol apresentaram recrudescência no período de tempo médio de 3-6 dias, enquanto para as tratadas com fex-sulfona o mesmo ocorreu em um período médio 4-7 dias. A linhagem Vero mostrou recrudescência após tratamento com benznidazol variando de 5-9 dias, enquanto para fex-sulfona o período foi de 9-11 dias pós-tratamento. No 11º dia foram visualizadas amastigotas intracelulares nos tratados com fex-sulfona. Não foi observada recrudescência do parasitismo nas placas tratadas com ravuconazol e posaconazol até o último dia de acompanhamento, em ambos tipos celulares. Enquanto que no controle tratado com 100 µM de alopurinol em 24h já foi possível visualizar formas tripomastigotas restantes. O alopurinol foi escolhido como controle de ineficácia devido ensaios realizados por Mazzeti *et al.* (2019), que demonstraram atividade limitada deste fármaco em experimentos *in vitro* (EC-50 de 915.96 µM), e não foi ativo em monoterapia *in vivo* utilizando camundongos (MAZZETI *et al.*, 2019).

Considerando que a microscopia óptica pode apresentar baixa sensibilidade para a detecção de recrudescência do parasito caso o número de amastigotas seja muito pequeno, as células utilizadas para o experimento de recrudescência foram recolhidas ao final do período de observação e a carga parasitária foi determinada por *qPCR*.

A estratégia de quantificação da carga parasitária utilizada neste trabalho consistiu na padronização de um método Ct comparativo, seguido do uso de uma amostra de referência de concentração conhecida de parasitos em pool de DNA

celular (VERO e H9C2). Então, uma curva padrão foi gerada a partir de diluições seriadas 1:10 no pool de DNA celular, para estimar a eficiência de amplificação e o limite de quantificação do parasito. Conforme pode ser observado na figura 6, a eficiência de amplificação do ensaio foi de 80% e o limite de quantificação foi de 0,01 parasito-equivalente/ μL de reação.

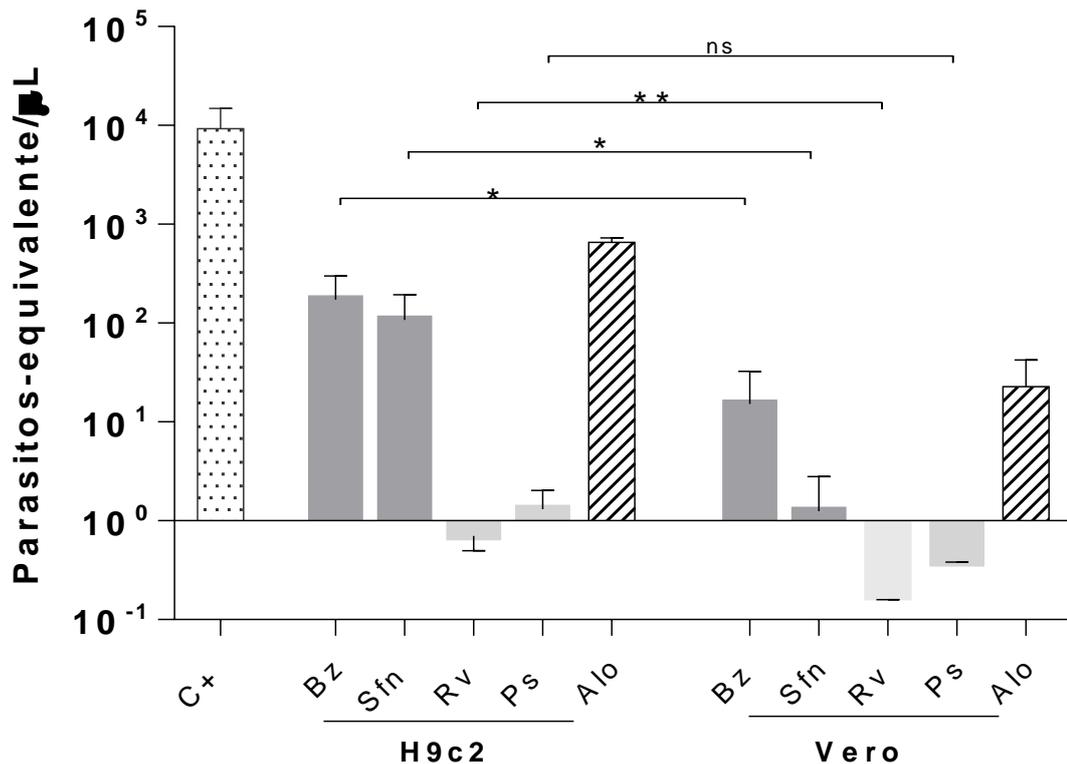
Figura 6- Curva padrão gerada a partir da diluição seriada 1:10 do DNA proveniente de 2×10^4 parasitos/ μL em DNA genômico de pool de células não infectadas (VERO + H9C2) para estimativas da eficiência de amplificação e limite de quantificação do ensaio de PCR em tempo real quantitativa.



Fonte: autor

A seguir foi realizada a quantificação do parasitismo. A figura 7 e Tabela 3 mostram a intensidade do parasitismo nas células Vero e H9c2 infectadas e tratadas ou não com os diferentes fármacos.

Figura 7- PCR em tempo real quantitativa. Resultados de carga de DNA parasitário observados em sobrenadante de raspado de culturas celulares infectadas por *T.cruzi* e submetidas ou não a diferentes fármacos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,006$; ns-não significativo. C+ - células infectadas e na ausência de fármaco; Bz- benznidazol (30 μM), Sfn- fex-sulfona (30 μM), Rv- ravuconazol (20 nM), Ps- posaconazol (20 nM), Alo- alopurinol (100 μM): controle de ineficácia.



Fonte: autor

De forma concordante com a microscopia, a carga parasitária foi maior nos grupos para os quais foi observada recrudescência do parasitismo por microscopia óptica; benznidazol, fex-sulfona, assim como o controle de inatividade alopurinol. Desta forma, notadamente a capacidade de resposta sustentada foi menor para os nitroheterocíclicos do que para os azólicos, particularmente nas células H9c2 (Figura 6). A potência do ravuconazol (DINIZ *et al.*, 2010; URBINA *et al.* 2003) e posaconazol (URBINA *et al.* 1998) em inibir amastigotas intracelulares é sabida, e sua ação é concentração e tempo-dependente (ADESSE *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram que em concentrações de 20nM tanto ravuconazol, quanto posaconazol foram capazes de sustentar a supressão da infecção por doze dias pós-tratamento pela microscopia óptica; os resultados de *qPCR*, dada a sensibilidade da técnica,

indicaram que apesar da baixíssima carga parasitária observada para os azólicos, não houve eliminação da infecção.

Já o benznidazol e o fex- sulfona, possuem ação mais rápida (em termos de tempo-dependência) se comparados aos azólicos (SYKES; AVERY, 2015), provavelmente relacionada ao mecanismo de ação dos fármacos. Enquanto os azólicos inibem biossíntese de ergosterol, os nitroimidazóis após ativação por nitroredutases interferem em macromoléculas do parasito. No entanto, nossos achados por microscopia óptica demonstraram que a eliminação de parasitos após tratamento com benznidazol e fex-sulfona foram sustentados por máximo 11 dias. Curiosamente, a faixa terapêutica considerada para o benznidazol para fins de estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos é de 11,5 a 23 μM (Raaflaub e Ziegler, 1979), inferior à utilizada no presente estudo. No entanto, os procedimentos utilizados para a definição da faixa terapêutica não são claros.

De forma geral, podemos sugerir que a capacidade de supressão da infecção pelos derivados azólicos foi maior comparativamente aos nitroimidazólicos no período estudado, apesar de não ter eliminação do parasitismo (mostrada por PCR). Esses resultados conflitam com a literatura, especialmente Sykes e Avery (2018), que observaram recrudescência do parasitismo 2 dias após tirar a pressão do posaconazol. Fatores como tipo celular hospedeiro e concentrações do fármaco podem contribuir para explicar a discordância. Os autores utilizaram tripomastigotas metacíclicos da cepa Tulahuen para infectar fibroblastos 3T3 que foram incubados por 24, 48 e 96h em uma concentração de 1 μM ; apesar da concentração 50 vezes menor, no presente estudo o tempo de tratamento com posaconazol foi de 7 dias.

De forma interessante, apesar de o perfil de recrudescência das diferentes classes farmacológicas ter se mantido nas células Vero e H9c2, é evidente que, assim como a recrudescência é mais lenta em Vero, a carga parasitária foi significativamente menor para os nitroheterocíclicos e ravuconazol. A linhagem Vero recentemente foi descrita como mais susceptível a fármacos (FRANCO *et al.*, 2019), comparativamente a outros tipos celulares. Corroborando com esses dados, neste trabalho foi observado maior tempo de sustentação do efeito dos fármacos pós-tratamento das células Vero infectadas, sugerindo que a ação tripanossomicida nesse modelo pode ser favorecida (DINIZ *et al.*, 2018). Adicionalmente, foram observados valores de EC-50 menores e carga parasitária menor do que os observados para a H9c2 (Tabela 2 e Figura 7).

Os perfis identificados para os azólicos e benznidazol são similares ao que é observado na infecção *in vivo* pela mesma cepa (Y), na qual a parasitemia é suprimida durante o tratamento da infecção murina, no entanto, há recrudescência natural do parasitismo em períodos variáveis de tempo (inversamente proporcionais à dose e relacionados ao mecanismo de ação dos fármacos) quando o tratamento é suspenso (MACHADO *et al.*, 2020; MAZZETI *et al.*, 2018). De forma diferente, fex- sulfona é mais eficaz que o benznidazol e azólicos no tratamento da cepa Y, mas o padrão de recrudescência *in vitro* foi similar. A utilização de concentrações (30uM) abaixo dos valores de EC-90 identificados nos modelos avaliados (de 54 a 69µM) podem ter colaborado para esse efeito.

Nossos resultados mostraram que a ação tripanossomicida rápida não garante a eliminação total de parasitos, mas a pressão prolongada, aliada a concentrações adequadas que reflitam a faixa terapêutica do fármaco podem ser fatores importantes para entender o reaparecimento de parasito e definir novas estratégias.

7 CONCLUSÃO

- A célula hospedeira influencia na atividade anti- *T. cruzi* dos fármacos e esse fator pode ter impacto no *screening* de moléculas tripanossomicidas;
- Células H9c2 representam um modelo de avaliação mais estrigente para utilização em *screenings* de moléculas tripanossomicidas;
- O modelo padronizado para avaliação de supressão e recrudescência do parasitismo em placas é uma estratégia adequada para validação do potencial terapêutico de fármacos tripanossomicidas antes de avançar para estudos pré-clínicos *in vivo*;
- Derivados azólicos induzem supressão do parasitismo sustentada, porém não eliminam a infecção;
- O mecanismo de ação da molécula, juntamente ao tipo celular, são fatores que devem ser considerados na experimentação *in vitro* anti- *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ADESSE, D. *et al.* Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 55, n. 1, p. 203–210, 2010.
- ANDRADE, L.O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, NL: Elsevier Biomedical Press, v. 100, p. 163–172, 1999.
- ANDRADE, A L. *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, Minneapolis, Minn., US: Lancet Publications, v. 348, n. 9039, p. 1407–13, 1996.
- ARIAS-DEL-ANGEL, J. A. *et al.* Dynamics of Mammalian Cell Infection by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, **Front. Microbiol., Suíça**, 2020.
- BAHIA, M.T. *et al.* Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n.11, 2012.
- BAHIA, M. T. *et al.* Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole Metabolites, Potential New Drug Candidates for Chagas Disease. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 58, n. 8, p. 4362-4370, 2014.
- BAHIA, M. T., DINIZ, L. F., MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–1237, 2014.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, 2013.
- BENDITA, C.; BRIEFING, S. **The BENDITA study: A Phase II study to assess safety, tolerability, and efficacy of different benznidazole regimens, alone and in combination with fosravuconazole.** [s.l: s.n.],2019.
- BOCCHI, E. A. Heart failure in South America. **Current Cardiology Review**, v. 9, p.147–156, 2013.
- BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and pathogenesis of rheumatic heart disease. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, India, IN: Indian Association of Pathologists and Microbiologists, v. 50, n. 4, p. 685–697, 2019.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and drugs resistance**, v. 2, p. 236-242, 2012.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, Ill., US: University of Chicago Press, v. 209, n. 1, p. 150–162, 2014.

CAL, M. *et al.* Assessing anti-*T. cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidal activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, p. 165-170, 2016.

CALDAS, I. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 118, n. 3, p. 315-323, 2008.

CALDAS, I. S. *et al.* Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. **TM & IH. Tropical Medicine and International Health**, v. 18, p. 75-84, 2013.

CAMPOS, M. C. *et al.* Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the frontline drug benznidazole. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 14407, 2017.

CANÇADO, J. R. 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.

CARADONNA, K. L. *et al.* Host metabolism regulates intracelular growth of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Host Microbe**, v.13, n. 1, p. 108–117, 2013.

CHABEN, I. Pautas para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Argentina, Buenos Aires: Ministerio de Salud, 2015. Disponível em: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001391cnt-Chagas%20Guia%20para%20equipos%20de%20salud%20-%203era%20edicion%202018.pdf> (Acesso em 8 agosto de 2019).

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem.** **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1909. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008 (Acesso em 8 agosto de 2019).

CHATELAIN *et al.* Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 141-153, 2017.

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

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

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

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

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

DEEKS, E. D. Fexinidazole: First Global Approval. *Drugs*, 2019.

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

DINIA, L. DE F. *et al.* Effects of Ravuconazole Treatment on Parasite Load and Immune Response in Dogs Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 54, n. 7, p. 2979-2986, 2010.

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

DINIZ, L. DE F. *et al.* Outcome of E1224-Benznidazole Combination Treatment for Infection with a Multidrug-Resistant *Trypanosoma cruzi* Strain in Mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v.62, n. 6, 2018.

DOS SANTOS, F. M. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance in vivo and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 120, n. 4, p. 385-90, 2008.

DUMOULIN, P. C.; BURLEIGH, B. A. Stress-Induced Proliferation and Cell Cycle Plasticity of Intracellular *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. **mBio**, v.9, n 4, 2018.

DURAN-REHBEIN, G. A. *et al.* Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. **Parasite**, Paris, v. 21, p. 38-46, 2014.

FLORES-FERRER, A. *et al.* Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we 76 know and what do we need? **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 4, p. 470–487, 2018.

- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, GB: Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.
- FRANCO, C. H. *et al.* Drug Discovery for Chagas Disease: Impact of Different Host Cell Lines on Assay Performance and Hit Compound Selection. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 82, 2019.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, p. 22–27, 2010.
- GUEDES, P. M. M. *et al.* Activity of the New Triazole Derivative Albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Dog Hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 48, n. 11, p. 4286-4292, 2004.
- GUEDES, P. M. M. *et al.* Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, n. 5, p. 609-620, 2011.
- HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure, **Science**, v. 354, n. 6318, 2016.
- LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect. Disease**, v.13, p. 342–348, 2013.
- LOUCH, W. E.; SHEEHAN, K. A.; WOLSKA, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, GB: Academic Press, v. 51, n. 3, p. 288–298, 2011.
- LUNA, K. P. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomédica [online]**, v.29, n.3, p.448-455, 2009.
- MACHADO, Y. A. *et al.* Amlodipine increases the therapeutic potential of ravuconazole upon T infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Online)**, p. AAC.02497-19, 2020.
- MARKUS, M. B. Dormancy in mammalian malaria. **Trends Parasitol**, v. 28, p. 39–45, 2012.
- MAZZETI, A. L. *et al.* Synergic Effect of Allopurinol in Combination with Nitroheterocyclic Compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Online)**, v. 63, n. 6, 2019.
- MAZZETI, A. L. *et al.* Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: A pre-clinical study. **Biochemical Pharmacology**, New York, US: Pergamon Press, v. 148, p. 213–221, 2018.

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

MOLINA, J. A. P.; MOLINA, I. Chagas Disease. **The Lancet**, Minneapolis, Minn., US: Lancet Publications, v.391, p. 82-94, 2018.

MORAES, C. B. *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Sci. Rep.**, v. 4, p. 1-11, 2014.

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

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

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.

PAHO (Pan American Health Organization). Chagas disease portal. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> (Acesso em 10 setembro de 2020).

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, Oxford, Inglaterra, GB: Elsevier Science. v.30, p. 289–298, 2014.

PERIN, L. *et al.* Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 61, n. 4, 2017.

PERIN, L. *et al.* Population pharmacokinetics and biodistribution of benznidazole in mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 8, p. 2213–222, 2020.

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

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

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p. 1611-1614, 1979.

RASSI, A. *et al.* Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, London, GB: British Medical Journal Publishing, v. 95, p. 524–534, 2009. doi:10.1136/hrt.2008.159624

RESENDE, B. C. *et al.* The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 5, 2020.

REVOLLO, S. *et al.* *In Vitro* Benznidazole and Nifurtimox Susceptibility Profile of *Trypanosoma cruzi* Strains Belonging to Discrete Typing Units TcI, TcII, and TcV. **Journals Pathogens**, v. 8, n. 4, 2019.

SANCHEZ-VALDEZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, p. 120, 2018.

SANTOS, F. M. *et al.* Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1987–1995, 2012.

SEIFERT, K. *et al.* *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, GB: Oxford University Press v. 65, n. 3, p. 508-11, 2010.

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

STORDEUR, P. *et al.* Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 259, n. 2, p. 55-64, 2002.

SYKES, M. L. *et al.* Investigation of pyrimidine nucleoside analogues as chemical probes to assess compound effects on the proliferation of *Trypanosoma cruzi* intracellular parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, 2020.

SYKES, M.L.; AVERY, V. M. Development and application of a sensitive phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Int J Parasitol-Drug**, v. 5, p. 215-228, 2015.

SYKES, M.L.; AVERY, V. M. 3-pyridyl inhibitors with novel activity against *Trypanosoma cruzi* reveal *in vitro* profiles can aid prediction of putative cytochrome P450 inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 4901, 2018.

TEGAZZINI, D. *et al.* A Replicative *In Vitro* Assay for Drug Discovery against *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, Bethesda, Md., US, v. 60, p. 3524–3532, 2016.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011

TORRICO, F, *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Disease**, Minneapolis, Minn., US: Lancet Publications v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

URBINA, J. A. *et al.* Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum)cruzi*: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 42, n. 7, p. 1771-1777, 1998.

URBINA, J. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 27–38, 2003.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, Oxford, Inglaterra, GB: Elsevier Science, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

VARGAS-ZAMBRANO, J. C. *et al.* A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 212–219, 2013.

VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial, **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, Pa., US: American College of Physicians v. 144, p. 724–734, 2006.

VIOTTI, R. *et al.* Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, Md., US, v. 58, p. 635–639, doi:10.1128/aac.01662-13, 2013.

VILLARREAL *et al.* Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Experimental Parasitology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 108, n. 2, p. 24-31, 2004

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

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

WYATT, T. T.; WÖSTEN, H. A. B.; DIJKSTERJUIS, J. Fungal Spores for Dispersion in Space and Time, 1st Edn. **Elsevier Inc**, v. 85, 2013

WHO. Chagas disease (also known as American tripanosomiasis). Março, 2020.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Genebra, 2010.

WHO. Newsbriefs. Brazil marks Chagas milestone. **The Newsletter of the Pan American Health Organization**, 2006. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10244:2014-paho-celebrates-112th-anniversary&Itemid=135&lang=en (Acesso em 10 setembro de 2020).

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v.104, n. 7, p. 1051 – 1054, 2009.

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

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious disease**, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Trop.** v. 184, p. 38–52, 2018.