

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Eficácia da combinação de ravuconazol ou seu pró-fármaco E1224 com
o metabólito sulfona do fexinidazol no tratamento da infecção
experimental por *Trypanosoma cruzi***

LUDMILLA WALTER REIS MOTA

OURO PRETO

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AUTOR: Ludmilla Walter Reis Mota

ORIENTADORA: Livia de Figueiredo Diniz

CO-ORIENTADORA: Maria Terezinha Bahia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

OURO PRETO

2014

M917e Mota, Ludmilla Walter Reis.
Eficácia da combinação de ravuconazol ou seu pró-fármaco E1224 com o metabólito sulfona do fexinidazol no tratamento da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Ludmilla Walter Reis Mota. - 2014.
75f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Livia de Figueiredo Diniz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Quimioterapia. 2. *Trypanosoma cruzi*. I. Diniz, Livia de Figueiredo. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 615.28:616.937



Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Avaliação pré-clínica da combinação utilizando o metabólito sulfona do fexinidazol e o E1224 na infecção por *Trypanosoma cruzi*”

Aos dezoito do mês de dezembro de 2014, às 09:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Ludmilla Walter Reis Mota**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Livia de Figueiredo Diniz
Presidente (UFOP)

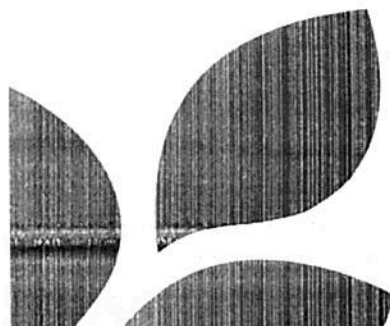
Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares
Examinador (FIOCRUZ)

DATA DA DEFESA: 18/12/2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol



DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Garibaldi e Consolação;
irmãs Débora e Vívian e marido Gilberto.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, por me conceder tantas bênçãos;

Papai, por me mostrar que é sempre possível ser mais forte; Mamãe, por me ensinar a ter fé e por me incentivar; Débora e Vívian, por sermos tão amigas. Gilberto, que sonha junto comigo, meu amor para vida toda! Vocês me completam!

A todos do Laboratório de doença de Chagas: técnicos, alunos e professores;

Aos colegas de mestrado pelos bons momentos em sala de aula;

Aos professores pelos ensinamentos;

A Nicole e Ana Lia pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho;

Ruan, Dário, Karol, Álvaro e Guilherme pelo apoio na experimentação *in vivo*;

À professora Maria Terezinha por mostrar o quanto é bonito o mundo científico;

A Lívia pela orientação impecável. Exemplo de dedicação e compromisso com o trabalho. Obrigada por tudo!

A Ana Luísa, por ser tão doce, por me alegrar e confiar em mim;

Ao Centro de Ciência Animal e aos secretários do NUPEB por serem tão prestativos;

Aos laboratórios de Imunoparasitologia, de Doenças Parasitárias e de Epidemiologia Molecular pelas colaborações;

Ao Sindicato ASSUFOP, por querer sempre a capacitação e qualificação dos técnicos administrativos;

À DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) pelo apoio financeiro;

À UFOP por fazer parte de todas as etapas da minha vida!

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	IX
Lista de siglas e abreviaturas	XI
1. Introdução	1
2. Justificativa	12
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo Geral	15
3.2. Objetivos Específicos	15
4. Metodologia	16
4.1. Parasito	17
4.2. Fármacos	17
4.3. Experimentos <i>in vitro</i>	19
4.3.1. Cultivo de células H9c2	19
4.3.2. Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular	19
4.3.3. Avaliação da atividade anti-<i>T. cruzi</i> dos fármacos ravuconazol, fex-sulfóxido, fex-sulfona e benznidazol sobre formas amastigotas: definição da IC-50	20
4.3.4. Ensaio de citotoxicidade	21
4.3.5. Avaliação da interação fex-sulfóxido/ravuconazol e fex-sulfona/ravuconazol sobre formas amastigotas	22
4.3.6. Análise estatística – experimentos <i>in vitro</i>	23
4.4. Experimentos <i>in vivo</i>	24
4.4.1. Modelo animal	24
4.4.2. Infecção e esquema de tratamento	24
4.4.3. Avaliação da eficácia do tratamento com fex - sulfona em combinação com ravuconazol	25

4.4.4. Exame de sangue a fresco.....	26
4.4.5. Extração de DNA e realização da PCR de sangue periférico.....	26
4.4.6. Mortalidade e peso.....	27
4.4.7. Avaliação sorológica.....	28
4.4.8. Análise estatística dos experimentos <i>in vivo</i>	28
5. Resultados.....	29
5.1. Resultados <i>in vitro</i>	30
5.1.1. Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosomacruzi</i> do fex-sulfona, fex-sulfóxido e ravuconazol e suas combinações utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y.....	30
5.1.2. Determinação da citotoxicidade dos compostos avaliados e de suas combinações para células H9c2.....	31
5.1.3. Determinação da natureza <i>in vitro</i> entre fex-sulfona e ravuconazol.....	32
5.2. Resultados <i>in vivo</i>	35
6. Discussão.....	43
7. Conclusão.....	54
8. Referências bibliográficas.....	56

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com o derivado sulfona do fexinidazol (SfN) em combinação com o E1224 (pró-fármaco do ravuconazol- Rv) na infecção experimental por *T. cruzi*. Após a determinação dos valores de IC-50 de SfN e Rv sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y, foi determinada a natureza da interação entre esses fármacos *in vitro*. As células infectadas foram incubadas com os diferentes fármacos isoladamente ou combinados em proporções fixas. SfN e Rv não apresentaram interação *in vitro* na eliminação de formas amastigotas, resultando em efeito aditivo (média de Σ FIC= 1,08±0,7). Adicionalmente, as combinações de fármacos não induziram citotoxicidade em células H9c2 na ausência de infecção. A partir desses dados foi investigado o efeito *in vivo* das combinações usando modelo murino de infecção aguda. Nessa etapa camundongos Swiss fêmeas foram inoculados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Após a detecção da parasitemia os animais foram tratados com doses subótimas de E1224 (2,5 e 5 mg por Kg de peso corporal-mg/Kg) e fex-sulfona (25 e 50mg/Kg), isoladamente ou em combinação por 20 dias. Foi também avaliado o efeito do tratamento na resposta imune humoral, por meio da detecção de anticorpos IgG anti-*T-cruzi* aos 180 dias após o tratamento. Os resultados mostraram que todos os tratamentos foram bem tolerados e eficientes em proteger os animais da mortalidade que acometeu 100% dos animais infectados e não tratados. A subdoses de SfN e E1224 quando combinadas foram mais eficientes em induzir cura do que quando usadas em monoterapia. Nos grupos tratados com E1224 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg, foi observada cura em 2/7 (28,5%) e 3/7 (42,8%) dos animais, respectivamente. No caso dos tratamentos com SfN, foi observada reativação natural da parasitemia em todos os animais. De forma interessante, nos grupos de animais tratados com ambas as combinações, 85,7% de cura foi observada, percentual próximo do obtido com a utilização de doses ótimas de cada fármaco. Esses resultados demonstraram o benefício resultante da administração combinada de SfN e E1224 *in vivo* e indicaram que combinações aditivas *in vitro* devem ser submetidas a avaliações *in vivo*.

ABSTRACT

The drugs used to treat Chagas' disease, benznidazole and nifurtimox, have limitations related to variable efficacy, long treatment courses and toxicity. In the last years, a number of compounds have been evaluated in preclinical studies, however, few of them were able to induce parasitological cure. New safe and effective treatments are urgently needed. Nowadays, combination therapy is the most promising strategy to treat Chagas disease. In this way, the aim of this study was to evaluate the effect of drug combinations using fexinidazole-sulfone and ravuconazole (or E1224, the ravuconazole prodrug) upon *T. cruzi* infection *in vitro* and *in vivo*. First, the nature of Rv and SfN interaction was assessed in a standard 72hr assay. H9c2 cells infect with Y *T. cruzi* strain were incubated with the drugs isolated and in combination using a modified fixed ratio. To classify the interactions, the fractional inhibitory concentration (FIC) and sum FICs \sum FIC were calculated to each combination. The drug combinations were considered synergistic for \sum FIC < 0.5, indifferent for \sum FIC between 0.5 and 4, and antagonistic for \sum FIC > 4. The SfN/Rv interaction *in vitro* can be classified as an additive effect, (mean \sum FIC = 1,08 ± 0,7). Considering these results the *in vivo* effect of the same combinations using a murine model of acute *T. cruzi* infection was verified. Female Swiss mice were infected with blood trypomastigotes of Y strain. Oral treatment of infected animals was administered at the detection of parasitemia, 4th day post-inoculation. Suboptimal doses of SfN (25 and 50 mg per kilogram of bodyweight-mg/Kg) and E1224 (5 and 2.5mg/Kg) were administered in monotherapy or combinations for 20 days. The results demonstrated that all treatments were well tolerated and protected the mice of mortality. The combined treatments were more efficient in induce parasitological cure than the same doses in monotherapy. The treatments with sulfone at different doses were unable to induce parasitological cure, while in mice treated with E1224 at 2.5 and 5.0 mg/Kg a cure rate of 28,5% and 42,8% was obtained, respectively. On the other hand, the combined treatments using different doses induced 85.7% of cure in *T. cruzi* infected mice. Interesting, the combined therapy using suboptimal doses of each compound induce cure indexes near to detected among animals that received each drug alone, but in the optimal doses. These results showed the beneficial effects of combination therapy using SfN and E1224 and indicated that *in vitro* effect can be predictive of the *in vivo* interaction between different compounds.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ENZIMAS DA VIA DE BIOSÍNTESE DO ERGOSTEROL QUE SÃO ALVOS DE FÁRMACOS.....	9
FIGURA 2: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FÁRMACOS.....	18
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO CRONOLÓGICA DO EXPERIMENTO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DE CURA.....	25
FIGURA 4: ATIVIDADE DO SULFOXIDO (SFX), FEX-SULFONA (SFN), RAVUCONAZOL (RV) E BENZNIDAZOL (BZ) SOBRE AMASTIGOTAS DA CEPA Y DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	30
FIGURA 5: PERCENTUAL DE REDUÇÃO DA RESAZURINA POR CÉLULAS H9C2 INCUBADAS POR 72 HORAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FEX-SULFÓXIDO (SX), FEX-SULFONA (SFN), RAVUCONAZOL, DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) E COM COMBINAÇÕES DE FEX-SULFÓXIDO E RAVUCONAZOL (SFX+RV) E FEX-SULFONA E RAVUCONAZOL (SFN+RV).....	32
FIGURA 6: CURVAS DE DOSE-RESPOSTA REPRESENTATIVAS DA INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE FEX-SULFONA E RAVUCONAZOL SOBRE A INFECÇÃO DE CÉLULAS H9C2 PELA CEPA Y DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	33
FIGURA 7: ISOBOLOGRAMA REPRESENTATIVO DA INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> CONTRA AMASTIGOTAS DA CEPA Y DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	35
FIGURA 8: EFICÁCIA DO E1224 E FEX-SULFONA (SFN) EM SUPRIMIR A PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA Y DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	37
FIGURA 9: PERCENTUAL DE GANHO DE PESO OBSERVADO EM ANIMAIS INOCULADOS COM A CEPA Y DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E TRATADOS.....	39
FIGURA 10: NÍVEIS DE ANTICORPOS DA CLASSE IGG DETECTADOS NO SORO DOS ANIMAIS (180 DIAS APÓS O TRATAMENTO) INFECTADOS PELA CEPA Y DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E TRATADOS E1224 E FEX-SULFONA EM MONOTERAPIA OU EM COMBINAÇÃO.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PROPORÇÕES DE FEX-SULFÓXIDO/ FEX-SULFONA E RAVUCONAZOL UTILIZADAS NO EXPERIMENTO DE COMBINAÇÃO <i>IN VITRO</i> MÉTODO DE PROPORÇÕES FIXAS.....	23
TABELA 2: EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA FEX-SULFONA E RAVUCONAZOL EM COMBINAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÉLULAS H9C2 INFECTADAS PELA CEPA Y DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> : FICS DA IC-50.....	34
TABELA 3: RESULTADOS DOS TESTES REALIZADOS NO CONTROLE DE CURA DOS ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA Y E TRATADOS COM E1224 E O METABÓLITO FEX-SULFONA DO FEXINIDAZOL EM MONOTERAPIA OU EM COMBINAÇÃO POR 20 DIAS CONSECUTIVOS.....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Percentual	mM	Concentração milimolar
µg	Micrograma	µL	Microlitro
µl	Microlitros	mL	Mililitro
Bz	Benznidazol	ng	Nanograma
Cy	Ciclofosfamida	µg	Micrograma
DNA	Ácido desoxirribonucléico	mg	Miligrama
DMEM	DulbecosMedium	mpk	Miligramas por quilograma
DNDi	Drugs for Neglected Disease <i>initiative</i>	Nfx	Nifutimox
DTU	Discretetypingunits	OMS	Organização Mundial de Saúde
EDTA	Ácido etilenodietiletanolamínico	PCR	Reação em Cadeia Polimerase
ELISA	EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay	°C	Graus Celcius
g	Gramas	PBS	Tampão Salina Fosfato
HE	Hematoxilina – Eosina	Rv	Ravuconazol
IBE	Inibidor da Biossíntese de Ergosterol	SFB	Soro fetal bovino
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa	SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina G	pb	Pares de base
s	segundo	fex	fexinidazol
Kg	Quilograma	SfX	Fex-sulfóxido
LIT	LiverInfusionTryptose	SfN	Fex-sulfona
nM	Concentração nanomolar	rpm	Rotação por minuto
µM	Concentração micromolar	mm	milímetro

DMSO	dimetilsulfóxido
h	hora
nm	Nanômetro
H2O2	Água oxigenada
CYP	Genes citocromo P450
IC-50	Concentração inibitória de 50%
AUC	Área sobre a curva

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909, representa ainda um grave problema de saúde pública. A doença é endêmica no México, Américas Central e do Sul, onde afeta cerca de 8 milhões de indivíduos (Dias e Schofield, 1999; Prata, 2001, WHO, 2013). O agente etiológico é um protozoário hemoflagelado, denominado *T. cruzi* (Chagas, 1909), que possui um ciclo de vida complexo, envolvendo diferentes hospedeiros mamíferos e insetos pertencentes à ordem Hemiptera, conhecidos popularmente como barbeiros (Lambrecht, 1965; Zeledon & Rabinovich, 1981).

Os hemípteros transmissores de *T. cruzi* são insetos hematófagos, da subfamília Triatominae, porém somente alguns gêneros são importantes na infecção humana, sendo eles: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Silveira *et al.*, 1984). Ao realizar o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas, dando início ao ciclo do parasito no vetor. Tais formas, ao alcançarem o tubo digestivo do inseto se diferenciam em epimastigotas, as quais multiplicam-se por divisão binária no intestino médio e alcançando a porção posterior, iniciam o processo de metaciclogênese, originando as formas infectantes, os tripomastigotas metacíclicos (Garcia *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2009). As formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas fezes durante o repasto sanguíneo, penetrando pelo local da picada ou mucosas íntegras (Brenner, 1973; Andrade & Andrews, 2005). Uma vez no hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas metacíclicas infectam células nucleadas e se diferenciam em amastigotas, que são as formas intracelulares replicativas. Após vários ciclos de multiplicação, essas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que acarretam a lise da célula infectando células adjacentes ou tecidos distantes (Ley *et al.* 1988; Tyler e Engman, 2001). Uma vez no sangue, passam a ser denominados tripomastigotas sanguíneos e podem infectar outras células hospedeiras ou serem ingeridos pelo vetor, reiniciando o ciclo biológico do parasito (Brenner, 1973; De Souza, 1984; Kirchhoff, 1989; Andrade & Andrews, 2005; Stuart *et al.* 2008).

Apesar de a via vetorial ser a forma de transmissão epidemiologicamente mais relevante, o parasito pode infectar os hospedeiros vertebrados por meio de outras formas

que incluem a via oral, devido à ingestão de alimentos contaminados (Dias, 2006; Nóbrega *et al.*, 2009), transfusões sanguíneas (Schmunis, 1999), transplantes de órgãos (Altclas *et al.*, 2005), transmissão congênita (Torrico *et al.*, 2004) e acidentes de laboratório. Programas de controle que visavam à interrupção da transmissão por via vetorial e por transfusão sanguínea obtiveram sucesso em países endêmicos, especialmente os países do Cone Sul. A estratégia de controle foi baseada na eliminação do *Triatoma infestans*, a principal espécie domiciliada, e também no controle na triagem de doadores de sangue (Dias, 2002; Moncayo, 2009). Por outro lado, nas regiões onde o controle vetorial foi alcançado, outras formas de transmissão têm se tornado mais relevantes epidemiologicamente. Em países endêmicos, a transmissão oral tem assumido essa posição; no Brasil, entre 1965 e 2009, ocorreram sete a oito surtos fora da Bacia Amazônica (Shikanai-Yasuda, 2012). Em contraste, de 2000 a 2009, mais de 1000 casos agudos foram relatados em 138 surtos, sendo a maior parte na Amazônia Brasileira (Shikanai-Yasuda, 2012). Muitos destes surtos estão relacionados à ingestão de alimentos, como caldo de cana, açaí e água contaminada por triatomíneos ou suas fezes infectadas (Medeiros, 2008; Barbosa-Ferreira, 2010; Souza-Lima, 2013; Bastos, 2010; Dias, 2008).

Já em países não endêmicos, a doação de sangue e órgãos, além da infecção congênita são os principais modos de infecção (Schmunis, 2007, 2010). Em 2005, aproximadamente meio milhão de indivíduos da América Latina migraram para países da Europa, sendo que 2,9% destes estariam infectados por *T. cruzi* (Schmunis, 2010). Portanto, é necessário haver vigilância epidemiológica contínua e específica nos países afetados.

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda da doença humana inicia-se cerca de 7 a 15 dias após a infecção e é caracterizada por parasitemia patente, com intensa proliferação do parasito nos tecidos do hospedeiro. Neste momento os pacientes podem apresentar-se assintomáticos ou oligosintomáticos (Urbina & Do Campo, 2003; Remme e cols., 2006). Nesse caso as manifestações clínicas mais comuns são: febre, edema, poliadenia, complicações cardíacas, hepatoesplenomegalia (Dias, 1992). Cerca de 5-10% dos casos sintomáticos evoluem para óbito. Esses casos estão associados, principalmente, a indivíduos imunossuprimidos ou crianças, por apresentarem miocardite ou meningoencefalite grave, ou ambos (Brenner, 2000; Teixeira, *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2010). Em 90% dos

indivíduos infectados, as manifestações resolvem espontaneamente, em decorrência do desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (Rassi, *et al.*, 2010).

Após a fase aguda, a infecção evolui naturalmente para a fase crônica, caracterizada pela dificuldade de detecção do parasito no sangue periférico e parasitismo tissular escasso, sem sintomatologia evidente, não sendo possível detectar o parasito por meio de métodos parasitológicos diretos. Logo, a infecção é diagnosticada por meio de avaliação sorológica (Rossi & Bestetti, 1995; Dutra *et al.*, 2005). Esta fase pode ser subdividida em três formas clínicas: indeterminada, cardíaca e digestiva (Prata, 1990). A forma indeterminada, observada na maioria dos indivíduos infectados, é caracterizada por um longo período assintomático que pode durar toda a vida do indivíduo. Entretanto, 30-40% dos indivíduos podem desenvolver a forma cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva da doença (Coura 1983, 1985; Pereira 1985; Moncayo, 1999; Rassi *et al.*, 2010). A forma cardíaca é responsável pela maioria dos óbitos decorrentes da infecção chagásica, sendo considerada a forma clínica mais grave da infecção por *T. cruzi*. O acometimento cardíaco acarreta em arritmias, fenômenos tromboembólicos, falência cardíaca e morte súbita (Chapadeiro, 1999; Nunes *et al.*, 2012). Aproximadamente 6% dos indivíduos infectados por *T. cruzi* podem desenvolver a forma digestiva, que se expressa por anormalidades esofágicas e intestinais caracterizando o megaesôfago e o megacólon chagásicos (Rezende, 2000). Em relação à forma cardiodigestiva, não se conhece a sua prevalência. Essa forma é uma combinação da forma cardíaca ou com megaesôfago ou com megacólon, ou ambos. Sabe-se que, geralmente, o desenvolvimento de megaesôfago precede a doença no coração e doenças do cólon (Rassi, *et al.* 2012).

As diferentes formas clínicas observadas na infecção por *T. cruzi* induzem significativa morbidade em indivíduos adultos, economicamente produtivos. Isso se deve à ausência de medicamentos eficazes no tratamento da fase crônica da doença.

Fármacos disponíveis e estratégias promissoras para o tratamento etiológico da doença de Chagas

Desde a descoberta da doença de Chagas busca-se tratamento efetivo e bem tolerado para indivíduos infectados por *T. cruzi*. Os primeiros compostos testados foram

arsênio, fucsina, tartarato emético e cloreto de mercúrio por Mayer e Rocha Lima (1912, 1914). Porém, todos estes compostos apresentaram resultados insatisfatórios (Coura, 2010).

Brener (1968) realizou uma avaliação experimental da atividade anti-*T. cruzi*, “*in vivo*” e “*in vitro*”, de várias drogas já utilizadas para o tratamento de outras doenças. Os resultados obtidos por ele evidenciaram 27 compostos e mais de 30 antibióticos inativos. Algumas drogas apresentaram efeito supressor da parasitemia, mas não foram capazes de curar a infecção, como a bisquinaldina, as aminoquinoleínas, os arsenicais trivalentes, os aminoglicosídeos, os nitrofuranos e alguns antibióticos (Coura & Castro, 2002).

Entre as décadas de 60 e 70, uma nova classe de fármacos, os nitroheterocíclicos, foi introduzida na terapêutica da doença de Chagas (Bock *et al.*, 1969), o nifurtimox-Nfx (nitrofurano) e o benznidazol-Bz (nitroimidazol). Até os dias atuais, eles ainda são os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas. Eles atuam como pró-drogas que necessitam ser reduzidas por nitroredutases do parasito a fim de se tornarem ativas (Wilkinson *et al.*, 2008). O Bz gera metabólitos glioxal tóxicos para o parasito, enquanto o Nfx libera cátions nitroaniônicos e abre cadeias de nitrilas. Estes compostos interagem com uma série de biomoléculas, formando ligações com DNA e grupos tiol, gerando substâncias altamente reativas (Hall *et al.*, 2012). A utilização do nifurtimox no Brasil foi descontinuada, e o benznidazol é atualmente comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

De forma geral, quanto antes é instituído o tratamento com Bz, maiores são as chances de cura. Sua posologia baseia-se na administração oral de 5 a 7mg/kg, dividido em duas doses diárias durante 60 dias. Por possuir baixa solubilidade em água (Leonardi *et al.*, 2009) e limitada absorção gastrintestinal, é necessário administrar doses elevadas desse fármaco (Lamas *et al.*, 2006), o que induz muitas reações adversas. Em muitos casos há descontinuação do tratamento, contribuindo para o fracasso terapêutico (Cançado, 2002; Coura & Castro, 2002). Este composto tem sido recomendado no tratamento específico da infecção congênita; fases aguda e crônica recente, promovendo cura parasitológica em cerca de 60% a 75% desses casos (Russomando *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000; Schijman *et al.*, 2003; Burgos *et al.*, 2009; Chippaux *et al.*, 2010); De Andrade *et al.*, 1996; Sosa-Estani *et al.*, 1998; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1990; Andrade *et al.*, 1992; Bahia Oliveira *et al.*, 2000; Cançado, 2002; Sosa Estani e Segura, 1999; Silveira *et al.*, 2000; Streiger *et al.*, 2004; Escriba *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2009).

De forma diferente, índices de cura significativamente inferiores são encontrados quando o tratamento é iniciado na fase crônica tardia da doença. Estudos clínicos mostram ausência de cura ou índices de cura variando entre 5 a 19,1% (Ferreira, 1990; Viotti *et al.*, 1994; Braga *et al.*, 2000; Suasnabar *et al.*, 2000; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2009; Lana *et al.*, 2009). As razões para a diferença na eficácia dos compostos em relação às fases da doença ainda não são muito bem compreendidas. Podem estar relacionadas com propriedades farmacocinéticas desfavoráveis dos fármacos (Molina *et al.*, 2000); fatores inerentes ao hospedeiro (genética, resposta imune) e ao parasito, como a existência de cepas naturalmente resistentes ao Bz e ao Nfx *in vivo* (Filardi e Brener, 1987).

Como o tratamento etiológico disponível para a doença de Chagas é limitado, apresentando eficácia dependente da fase da infecção e efeitos colaterais importantes (Jackson *et al.*, 2010; Pinazo *et al.*, 2010), a busca por novos alvos e/ou novas estratégias terapêuticas é necessária.

Historicamente é observado um investimento extremamente reduzido na busca por novas drogas e estratégias para o tratamento da doença de Chagas, especialmente por razões econômicas, apesar da reconhecida expansão dessa doença para diversas partes do mundo (Coura e Vinas, 2010). Durante 1975 e 2004 somente 21 produtos, dos 1556 registrados, foram especificamente desenvolvidos para atender alguma doença negligenciada (Chatelain & Ioset, 2011). No entanto, o cenário tem melhorado nos últimos anos, com a criação de parcerias entre diversas iniciativas, organizações e instituições público-privadas. O preenchimento dessa lacuna melhorou a perspectiva da terapêutica da doença de Chagas, possibilitando otimizar o processo de desenvolvimento dos fármacos, desde as etapas de triagem de compostos até a disponibilização deles (Chatelain & Ioset, 2011).

Uma destas importantes organizações foi criada em 2003, a *Drugs for Neglected Tropical Diseases initiative* (DNDi). A missão dessa organização é buscar opções para tratamentos eficazes, seguros e acessíveis para pacientes com alguma doença negligenciada (Chatelain & Ioset, 2011). Nesse sentido, em 2006 foi iniciada, por meio da DNDi, uma extensa triagem de compostos a fim de identificar e resgatar drogas com atividade tripanocida. Dentre os compostos triados, o fexinidazol (fex), da classe dos nitroheterocíclicos, que está atualmente em estudos clínicos para tratamento da tripanosomíase africana (Torreele, *et al.*, 2010; Tarral, *et al.*, 2014). Neal & Bueren (1988) demonstraram *in vitro e in vivo* a atividade anti- *T. cruzi* do fexinidazol. Raether,

em 1983, havia demonstrado que este fármaco possui atividade ligeiramente superior ao benznidazol e ao nifurtimox na infecção murina experimental. No mesmo ano, a administração do fexinidazol em combinação com suramina foi eficaz em curar camundongos infectados por *T. brucei* (Jennings & Urquhart, 1983). Embora a eficácia deste fármaco tenha sido demonstrada, o seu desenvolvimento foi abandonado pela indústria farmacêutica Hoechst nos anos 70-80, que decidiu encerrar suas atividades em medicina tropical.

Em 2012, Bahia *et al.*, confirmaram que o fexinidazol é eficaz na cura da infecção experimental por *T. cruzi* em modelo murino, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença, incluindo infecções por cepas resistentes ao Bz. O mecanismo de ação do fexinidazol não é estabelecido, porém sabe-se que ele é metabolizado por oxidação resultando em dois compostos farmacologicamente ativos: o fex-sulfóxido (SfX) e fex-sulfona (SfN), ou seja, o fexinidazol atua como um pró-fármaco, com atividade atribuída a estes metabólitos (Brun *et al.*, 2011).

Bahia *et al.* (2014a) demonstraram que após a administração de fex-sulfóxido, tanto fexinidazol (fex) quanto os metabólitos fex-sulfona e fex-sulfóxido são detectados. Porém, as concentrações do fex são relativamente baixas e declinam rapidamente. Portanto, o fex não é o provável composto que contribui para o perfil da eficácia. Curiosamente, os valores da área sob a curva (AUC) para fex-sulfona eram comparáveis aos valores obtidos após a administração de fex-sulfóxido. Tal constatação sugeriu que o fex-sulfóxido é convertido em fex-sulfona. Logo, concluiu-se que não há benefícios, em termos de eficácia, em administrar o fex-sulfóxido e a fex-sulfona, quando comparados com a administração somente de fex-sulfona.

Ambos metabólitos do fexinidazol são eficazes no tratamento da infecção por *T. cruzi* com taxas de cura superiores ao fexinidazol e benznidazol em modelo murino na fase aguda (Bahia, *et al.*, 2014a). *In vitro*, a potência de ambos metabólitos é semelhante ao fexinidazol no tratamento da tripanosomíase africana (Torreele *et al.*, 2010). Em 2010, a DNDi deu início à ensaios clínicos de fase I do fexinidazol para avaliar sua segurança e farmacocinética em humanos, administrando doses simples e múltiplas. Em 2012, os ensaios de fase II e III foram iniciados para verificar a sua eficácia e segurança clínica (Tarral *et al.*, 2014).

Outras classes farmacológicas também têm sido testadas contra o *T. cruzi*. Podem ser citados derivados azólicos, os quais inibem a biossíntese de ergosterol (Molina *et al.*, 2000; Urbina & Docampo, 2003), inibidores da cruzipaina (Engel *et*

al., 1998), as arilimidamidas (Soeiro *et al.*, 2013a), inibidores da tripanotona redutase (Blau *et al.*, 2013), complexos de rutênio carreadores de moléculas com atividade tripanocida (Silva *et al.*, 2010) e inibidores da via de salvação de purinas (Perez-Mazliah *et al.*, 2013).

Dentre estas classes, os inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE), têm sido considerados os candidatos mais promissores (Urbina, 2009; Buckner, 2008; Buckner *et al.*, 2011; Soeiro *et al.*, 2013b; Benaim *et al.*, 2006.). O ergosterol é um componente estrutural essencial da membrana celular de fungos e de *T. cruzi* e a inibição dessa síntese tem provado ser eficaz em interferir na viabilidade e proliferação do parasito (Maya *et al.*, 2007; Urbina *et al.*, 1998; Urbina *et al.*, 2000; Urbina *et al.*, 2003b). A figura 1 demonstra a via de biossíntese de ergosterol e as várias enzimas que atuam nesta via. Dessa forma, muitos são os alvos para desenvolvimento de fármacos (Furlong, 1989; Duschak e Couto, 2007; Soeiro *et al.*, 2013b), pois a depleção do ergosterol pode causar a inibição da proliferação e induzir a morte destes parasitos (Braga *et al.*, 2004; Garzoni *et al.*, 2004).

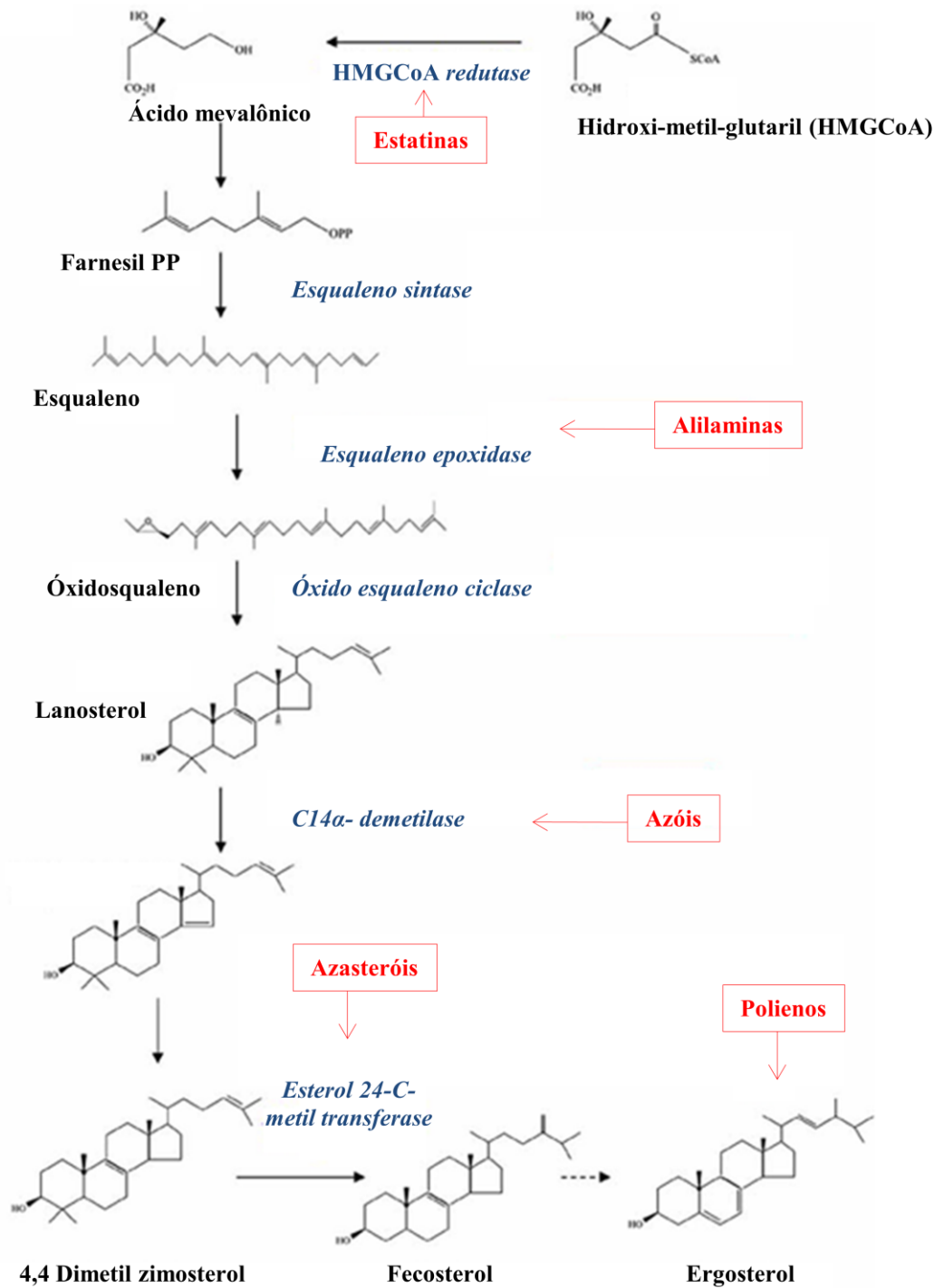


Figura 01: Enzimas da via de biossíntese do ergosterol que são alvos de drogas anti-*Trypanosoma cruzi*. O esquema mostra as estruturas químicas e nomes dos compostos principais e intermediários da biossíntese de ergosterol. Enzimas são mostradas em itálico azul e classes das drogas que atuam sobre elas são mostrados nos quadrados vermelhos. Adaptado de Duschack, 2011.

Particularmente um conjunto de fármacos tem se destacado por apresentar potente atividade anti-*T.cruzi*; são os inibidores da C-14 α -demetilase (CYP51). Estes

podem ser classificados em azólicos e não azólicos. Villalta *et al.*, (2013) investigaram o efeito de um composto não azólico, o VNI, sobre a infecção de camundongos com a cepa Tulahuen. Os autores demonstraram que esse composto foi eficaz em curar camundongos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção por esta cepa. Entretanto, não foi eficaz em curar camundongos infectados pelas cepas Y e Colombiana (Soeiro *et al.*, 2013b). Outro composto não azólico com potente atividade anti- *T. cruzi* é o fenarimol. Análogos desta molécula foram desenvolvidos com o objetivo de otimizar seu efeito (Keenan *et al.*, 2012). Dentre esses análogos, dois apresentaram índice de cura de 60% em camundongos (Keenan *et al.*, 2013). De qualquer forma, os resultados demonstraram que a resposta do tratamento experimental da infecção por *T. cruzi* com inibidores específicos da CYP51 é cepa-dependente, assim como verificado para derivados azólicos (Molina *et al.*, 2000; Urbina *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2003).

Os derivados azólicos são os inibidores “clássicos” da CYP51. Desenvolvidos originalmente como drogas antifúngicas, têm se mostrado promissores como alternativas para o tratamento da doença de Chagas (Urbina *et al.*, 2010). Esses compostos azólicos incluem derivados imidazólicos e triazólicos. Compostos triazólicos, como o posaconazol e o ravuconazol, apresentaram propriedades farmacocinéticas favoráveis no homem (amplo volume de distribuição e meia vida plasmática longa) e ação seletiva e potente contra o *T. cruzi*, apresentando eficácia em diferentes modelos animais e em ambas as fases da doença (Urbina, 2009).

A atividade anti-*T. cruzi* do posaconazol já foi comprovada por diversos estudos *in vitro* (Urbina *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2000; Benaim *et al.*, 2006; Veiga-Santos *et al.*, 2012) e *in vivo* (Molina *et al.*, 2000; Cencig *et al.*, 2012; Ferraz *et al.*, 2007; Olivieri *et al.*, 2010). Já o ravuconazol, apresenta potente atividade anti- *T. cruzi* *in vitro* (Urbina *et al.*, 2003b). Entretanto, sua ação *in vivo* no modelo de infecção aguda em camundongos e cães foi limitada (Urbina *et al.*, 2003b; Diniz *et al.*, 2010). Acredita-se que a falha terapêutica tenha ocorrido devido ao tempo de meia vida curto em ambos modelos que são 4,5h e 8,8h, respectivamente. Outro dado importante é que sua fração inibitória mínima em amastigotas foi de 1nM e seu tempo de meia vida em humanos é aproximadamente 120h (Mikamo *et al.*, 2002), além de possuir amplo volume de distribuição.

Baseado nessas considerações, a DNDi e Eisai são parceiras em um estudo clínico de fase II da pró-droga do Rv, o E1224. O E1224 é um pró-fármaco do Rv e tem

o mesmo alvo do composto parental, a enzima esterois C14 α -demetilase. Após metabolização hepática ele se converte em Rv, que é o fármaco ativo no organismo humano. Essa modificação garantiu melhora na absorção e biodisponibilidade do composto. Recentemente, o E1224 e o posaconazol foram avaliados em estudos clínicos de fase II para determinação de segurança e eficácia no tratamento da doença de Chagas crônica. Os resultados destes estudos demonstraram que apesar de ambos os fármacos apresentarem perfil favorável de segurança e toxicidade e terem sido eficazes na supressão da parasitemia durante o tratamento, houve falha terapêutica em cerca de 90% dos pacientes tratados. Logo, novos protocolos e estratégias de tratamento devem ser considerados (Torrice, 2013; Molina *et al.*, 2014).

Neste contexto, a possibilidade mais imediata para melhorar a eficácia do tratamento da doença seria a otimização de esquemas terapêuticos atuais e combinação de drogas. (Bahia *et al.*, 2014b). Essa estratégia já tem demonstrado bons resultados no tratamento de outras doenças infecciosas e parasitárias, como SIDA (Dybul *et al.*, 2002), tuberculose (Lienhardt *et al.*, 2012), malária (Hwang, 2006), toxoplasmose (Nye, 1979; Romand, 1993) e leishmaniose (Dastgheib, 2012).

A estratégia de combinar drogas de diferentes classes e mecanismos de ação pode melhorar a eficácia de tratamento, além de reduzir o tempo e a dose utilizada (Bahia *et al.*, 2014b). Neste contexto, estudos pré-clínicos visando à avaliação do tipo de interação entre diferentes fármacos são pertinentes, especialmente considerando a possibilidade de se detectar efeito sinérgico, ou mesmo aditivo entre os compostos avaliados em combinação (Planer *et al.*, 2014, Espuelas *et al.*, 2012; Bahia *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Por se tratar de uma doença negligenciada e sem tratamento efetivo durante a fase crônica, a doença de Chagas necessita de novas alternativas para o seu tratamento. Uma alternativa promissora e já utilizada com sucesso em tratamentos de diversas doenças (câncer, tuberculose, SIDA, toxoplasmose, leishmaniose e malária) é a terapia de combinação de fármacos. De forma similar, no tratamento da doença de Chagas experimental, essa estratégia também tem demonstrado ótimos resultados (Maldonado *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 2000; Benaim *et al.*, 2006; Fáundez *et al.*, 2008; Valdez *et al.*, *et al.*, 2011; Cencig *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2013; Grosso *et al.*, 2013; Bustamante *et al.*, 2014).

Neste contexto, tendo em vista: (i) o potente efeito tripanocida dos compostos E1224 e do fexinidazol na infecção de camundongos, (ii) a falha em curar a doença humana do E1224; (iii) as altas doses de fexinidazol necessárias para o tratamento de camundongos, (iv) o efeito benéfico da combinação benznidazol/posaconazol no tratamento da infecção de camundongos pelo *T. cruzi*; este estudo foi designado para avaliar a interação do E1224 e o metabólito fex-sulfona do fexinidazol sobre a infecção de camundongos por *T. cruzi*.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento combinado utilizando o ravuconazol ou o seu pró-fármaco e o metabólito sulfona do fexinidazol na infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente a atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos ravuconazol e metabólitos sulfóxido e sulfona do fexinidazol isoladamente utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*;
- Verificar a citotoxicidade das combinações dos diferentes fármacos em células H9c2;
- Classificar a natureza da interação entre o metabólito sulfona e o ravuconazol quando utilizados em combinação sobre células H9c2 infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*;
- Identificar o efeito do tratamento com diferentes doses de E1224 e fex-sulfona, em monoterapia ou em combinação, na evolução da infecção aguda de camundongos Swiss pela cepa Y de *T. cruzi* por meio dos parâmetros: exame de sangue a fresco e PCR.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Parasito

Utilizou-se a cepa Y do *T. cruzi* (DTU II) (Zingales *et al.*, 2009). Essa cepa foi isolada de um paciente na fase aguda da doença de Chagas por Pereira de Freitas, em 1950, em Marília (SP) e posteriormente estudada e descrita por Silva & Nussenzweig em 1953. A cepa Y foi escolhida por apresentar, nos estudos *in vivo*, características biológicas como a indução de alta parasitemia e 100% de mortalidade na infecção murina, facilitando, neste caso, a avaliação da atividade tripanocida de diferentes doses de cada composto, bem como das combinações. Além disso, possui perfil de resistência/susceptibilidade caracterizado como parcialmente resistente ao benznidazol (Filardi e Brener, 1987).

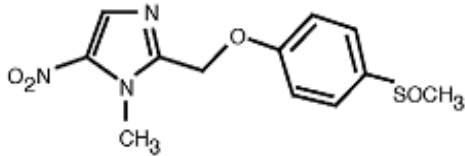
4.2 Fármacos

Os fármacos (Figura 2) utilizados para as avaliações *in vitro* e *in vivo*, em monoterapia ou em combinação foram:

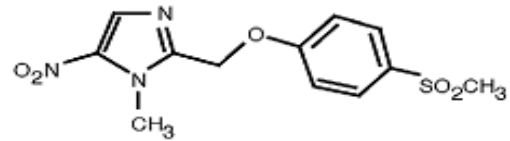
- Fex-sulfona (SfN): 1-methyl-2-(4-methylsulfonyl phenoxyethyl)-5-nitro imidazole (*Axyntis/Centipharm, France*), utilizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo*;
- Fex-sulfóxido (SfX): 1-methyl-2-(4-methylsulfinylethoxyethyl)-5-nitro imidazole (*Axyntis/Centipharm, France*), utilizado nos experimentos *in vitro*;
- Ravuconazol (Rv): ([R-(R*,R*)]-4-[2-[2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-thiazolyl]benzotrile) (*Eisai, Japão*), utilizado no experimento *in vitro*;

- E1224: pró-fármaco do ravuconazol, é um sal (monolisina-fosfato) fosforilado derivado do ravuconazol (Eisai, Japão), utilizado no experimento *in vivo*, devido às propriedades farmacocinéticas favoráveis;
- Benznidazol (Bz): 2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitroimidazoleacetamide) (Lafepe), utilizado como fármaco de referência nos experimentos *in vitro* e *in vivo*;

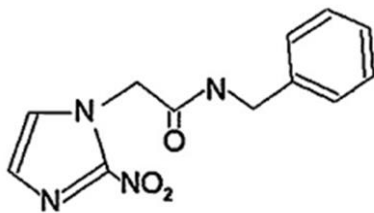
A



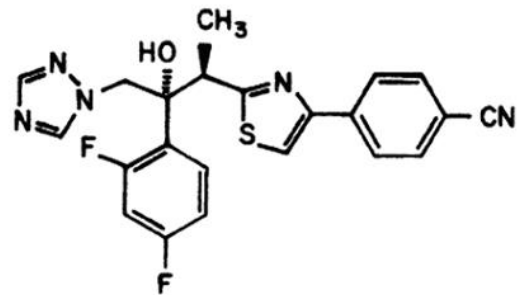
B



C



D



E

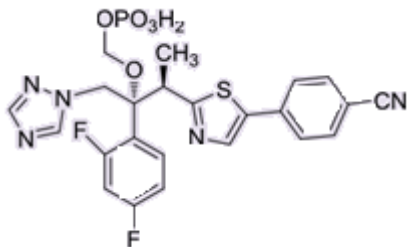


Figura 2: Estruturas químicas dos fármacos. (A) fex-sulfóxido; (B) fex-sulfona; (C) benznidazol; (D) ravuconazol e (E) E1224.

4.3. Experimentos *in vitro*

4.3.1 Cultivo de células H9c2

A linhagem celular H9c2 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL 1446) que provém de cardiomioblastos de ratos, foi mantida em garrafas de 75 cm² com meio DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina 2mM e 0,2% de gentamicina 200µg/ml e mercaptoetanol 50mM. Semanalmente, ou assim que atingiam a subconfluência, as células eram repicadas, utilizando-se tripsina 0,025% (p/v), para sua manutenção ou utilização nos experimentos.

4.3.2 Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular

Para se obter as formas tripomastigotas da cepa Y, células H9c2 cultivadas em garrafas de 75cm² em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, foram infectadas na proporção de 10 parasitos por célula, com tripomastigotas sanguíneos provenientes de sangue de camundongos infectados no pico de parasitemia, ou seja, no 8º dia de infecção. Após 24 horas de interação célula-parasito, em estufa a 37°C, 5% CO₂, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas sucessivamente com PBS para a retirada de parasitos não internalizados. Após lavagem, foi adicionando meio DMEM suplementado com 10% de SFB e as células incubadas a 33°C por 72 a 96 horas, quando o sobrenadante foi coletado e centrifugado, a 900rpm, 24°C, por 2 minutos, para remoção dos debris celulares. Posteriormente, o sobrenadante, rico em parasitos, foi centrifugado a 3000rpm, 4°C, 15 minutos e o sedimento ressuspendido em meio de cultura para posterior utilização nos experimentos. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer.

4.3.3 Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* dos fármacos ravuconazol, fex-sulfóxido, fex-sulfona e benznidazol sobre formas amastigotas: determinação da IC-50

A avaliação do efeito do tratamento com Rv, SfX e SfN sobre amastigotas da cepa Y foi realizada utilizando células H9c2 como hospedeiras. Foram plaqueadas 1×10^4 células por poço, sobre lamínulas de 13mm de diâmetro, em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Formas tripomastigotas originadas da cultura de células foram utilizadas para infecção em uma razão de 10:1 (parasitos:célula). Após 24 h de interação, o sobrenadante foi removido e cada poço foi lavado sucessivamente com PBS estéril, a fim de remover os parasitos não internalizados. Meio de cultura fresco contendo ou não os fármacos em diferentes concentrações foi adicionado a cada poço, em um volume total de 1mL. As células foram novamente incubadas por 72h, a 37°C. As concentrações iniciais de cada composto foram definidas a partir de experimentos preliminares (dados não mostrados), sendo 60µM para os metabólitos do fex e Bz e 0,4 nM para o Rv. Os fármacos foram avaliados em no mínimo 6 diluições seriadas 1:2. Em todos os experimentos foram utilizados controles, que corresponderam a células não infectadas e tratadas, não infectadas e não tratadas, infectadas e não tratadas.

Finalizadas as 72 horas de incubação das células infectadas e na presença ou ausência dos fármacos, as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol por 10 minutos e em seguida, coradas pela solução de Giemsa (10% em água destilada). Após secagem das lamínulas e montagem em lâmina com Entellan (Merck), determinou-se o número de células infectadas em uma contagem de no mínimo 200 células ao microscópio ótico (aumento de 1000x). O percentual de infecção observado nos poços tratados foi utilizado para calcular o percentual de redução do número de células infectadas com relação àqueles infectados e não tratados.

Esse percentual de inibição foi utilizado para a construção de curvas de dose-efeito e cálculo da IC-50 com auxílio dos softwares *Graph Pad Prism5* e *CalcuSyn*. Todos os experimentos com amastigotas foram realizados em duplicatas, em no mínimo 2 repetições.

4.3.4 Ensaio de citotoxicidade

Para excluir os efeitos tóxicos das drogas sobre as células hospedeiras, culturas e células H9c2 não infectadas por *T. cruzi* foram tratadas com concentrações dos fármacos (SfN, SfX, Rv), superiores ao valor de IC-50, isoladamente e em combinação. O experimento foi realizado conforme previamente otimizado (Diniz, 2013), utilizando a resazurina, um indicador colorimétrico de proliferação. Esse método se baseia na redução química do reagente devido à atividade metabólica celular. Através de reações de oxi-redução, o corante passa da cor azul (forma oxidada e não fluorescente) para rosa (forma reduzida, fluorescente), e esta mudança de cor pode ser medida pela leitura colorimétrica ou fluorimétrica (Fields e Lancaster, 1993; Ahmed *et al.*, 1994).

Assim, duzentos microlitros de suspensão das células H9c2, na concentração de 1×10^3 /mL foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°, 5% CO₂ por 24 horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio contendo ou não concentrações decrescentes de SfX, SfN (6 diluições 1:2, a partir de 200µM), ou Rv (6 diluições 1:2, a partir de 1nM) isoladamente ou em diferentes combinações, e a placa novamente incubada por 72 horas, a 37°C. Como controle de morte celular, foram utilizadas diferentes concentrações decrescentes de DMSO sabidamente tóxicas para as células (10%, 5%, 0,325% v/v). A placa também continha os controles negativos (meio+resazurina e apenas meio), controles positivos (meio+células) e controles para avaliar o potencial dos fármacos (meio+droga, na ausência de parasitos) ou do DMSO (meio+DMSO) em reduzir o corante. Após as 72 horas de incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina 1mM a cada poço. Passadas 6 horas de incubação a 37°C, a placa foi submetida à leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm. A porcentagem de redução do corante induzida pelos compostos foi calculada considerando o percentual de redução das células incubadas na ausência de drogas, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ redução} = [A_{570} - (A_{600} \times RO)_{\text{Tratado}} / A_{570} - (A_{600} \times RO)_{\text{Controle+}}]$$

Nessa fórmula, A₅₇₀= Absorbância a 570nm, A₆₀₀= Absorbância a 600nm, Controle + é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência do fármaco. RO é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células [RO = (A₅₇₀ / A₆₀₀)_{C-}].

4.3.5 Avaliação da interação fex-sulfona/ravuconazol sobre formas amastigotas

Para avaliar o tipo de interação entre SfN e Rv *in vitro*, os experimentos realizados basearam-se no método de proporções fixas (Fivelman *et al.*,2004). Os valores de IC-50 obtidos nos experimentos com cada fármaco isoladamente, foram utilizados para determinar as concentrações iniciais de SfN e Rv a serem usadas nos experimentos de combinação, de forma a garantir que o IC-50 de cada composto estivesse próximo da quarta diluição de uma série de 6 diluições. Dessa forma, as concentrações iniciais de SfN e Rv definidas a partir da IC-50 foram usadas para o preparo de soluções contendo ambos os fármacos, sempre em proporções fixas, numa razão de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de SfN:Rv.

As interações SfN e Rv foram avaliadas sobre amastigotas da cepa Y em células H9c2. Seis diluições 1:2 de cada fármaco isoladamente, assim como das misturas, foram utilizadas nestes experimentos (Tabela 1). Células não infectadas e tratadas foram avaliadas a fim de determinar a toxicidade da terapia de combinação. Células infectadas e não tratadas e células não infectadas e não tratadas foram utilizadas como controles. Células tratadas com benznidazol (concentração inicial de 60 μ M e diluição de 1:2) também foram utilizadas como controle. As concentrações iniciais de SfN e Rv, utilizadas isoladamente e no preparo das misturas foram, respectivamente, 60 μ M e 0,4nM. O sobrenadante foi removido após 72 horas de incubação a 37°C, e as células foram lavadas em PBS, fixadas e coradas para avaliação do percentual de infecção, como já descrito (item 4.3.3).

Tabela 1: Proporções fex-sulfona e ravuconazol utilizadas no experimento de combinação *in vitro* – Método de proporções fixas

SfN	Mistura 1	Mistura 2	Mistura 3	Mistura 4	Ravuconazol
4 x IC ₅₀	4 + 1	3 + 2	2 + 3	1 + 4	4 x IC ₅₀
2 x IC ₅₀					2 x IC ₅₀
IC ₅₀					IC ₅₀
$\frac{1}{2}$ IC ₅₀					$\frac{1}{2}$ IC ₅₀
$\frac{1}{4}$ IC ₅₀					$\frac{1}{4}$ IC ₅₀
$\frac{1}{8}$ IC ₅₀					$\frac{1}{8}$ IC ₅₀

↓
Diluições seriadas de 1:2

Foram realizadas 6 diluições seriadas na proporção de 1:2. Os valores de IC₅₀ de cada fármaco aproximam-se daquele observado na terceira ou quarta diluição de cada fármaco isoladamente (monoterapia). Cada mistura é obtida a partir de proporções definidas de SfN (fexinidazol-sulfona) e Rv (ravuconazol).

4.3.6. Análise estatística – experimentos *in vitro*

Os valores de IC-50 foram obtidos através do *software CalcuSyn*. Para classificar a natureza da interação entre SfN e Rv *in vitro*, utilizou-se a fração de concentração inibitória (FIC) e análise do isoblograma. FICs e a soma dos FICs (\sum FICs) foram calculadas da seguinte forma:

$$FIC A = \frac{A \text{ em combinação}}{A \text{ em monoterapia}}$$

Sendo A fex-sulfona ou ravuconazol

Esse cálculo foi feito para os valores obtidos em cada uma das diluições.

O índice de combinação CI (*combination index*), que corresponde ao somatório de FIC (Chou e Talalay, 1984) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\sum FICs = FICA + FIC B$$

Sendo, A fexinidazol-sulfona e B ravuconazol

A média do \sum FICs calculada foi usada para classificar a natureza da interação. Se <0,5 indica sinergismo; >0,5 e < 4, aditividade e se >4 indica antagonismo. Os isobogramas foram construídos plotando-se a FIC da IC-50 do SfN *versus* Rv. Os valores de IC-50 foram obtidos através do *software CalcuSyn*.

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Modelo Animal

Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, com idade entre 28 a 30 dias, pesando entre 17 e 24g, fornecidos e mantidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os experimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa do COBEA (Colégio Brasileiro de experimentação) e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFOP (Protocolo 2011/79).

4.4.2 Infecção e esquema de tratamento

Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, obtidas durante o pico de parasitemia. O tratamento foi iniciado no primeiro dia de parasitemia patente, isto é, 4^o dia após a infecção e teve a duração de 20 dias. Os animais infectados foram divididos em grupos de 7 animais, os quais receberam os fármacos em diferentes doses isoladas ou em combinações de SfN e E1224. A administração foi realizada por via oral usando gavagem. As doses utilizadas foram metade e um quarto das doses ótimas (cura 100%), segundo Bahia *et. al.*, 2014 e Diniz *et.al.* (dados não publicados).

Os seguintes grupos experimentais foram avaliados:

- (i) monoterapia utilizando SfN 25mpk e 50mpk;
- (ii) monoterapia utilizando E1224 2,5 mpk e 5,0 mpk;
- (iii) combinação utilizando SfN 25mpk + E1224 5 mpk;
- (iv) combinação utilizando SfN 50mpk + E1224 2,5 mpk;
- (v) benznidazol 100 mpk (tratamento de referência);
- (vi) controle não infectado;
- (vii) controle infectado e não tratado.

4.4.3. Avaliação da eficácia do tratamento com fex-sulfona em combinação com ravuconazol

A eficácia terapêutica foi determinada a partir da análise de testes independentes (Caldas, *et.al.*,2008): exame de sangue a fresco, antes e após imunossupressão com ciclofosfamida (Cy) (*Baxter Oncology, Alemanha*), além do teste de PCR em tempo real 30 e 180 dias após o tratamento. Os animais foram considerados curados quando apresentaram resultados negativos nos testes realizados.

O exame de sangue a fresco foi realizado durante e até 30 dias após o tratamento para detectar a ocorrência de supressão da parasitemia e/ou a reativação natural desta após o término do tratamento. Assim, os animais que não apresentaram a reativação após o tratamento foram submetidos a três ciclos de imunossupressão com Cy, dose de 50mg/Kg, via intraperitoneal. Cada ciclo foi composto de 4 dias consecutivos de administração, com intervalo de 3 dias entre cada ciclo. Logo, a parasitemia foi avaliada diariamente, durante e até 10 dias após a imunossupressão. Amostras de sangue para avaliação sorológica dos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgG total) foram coletadas aos 180 dias após o fim do tratamento. Apenas os animais que apresentaram resultados negativos nos testes anteriores tiveram o sangue coletado para análise por PCR em Tempo Real (Figura 03).

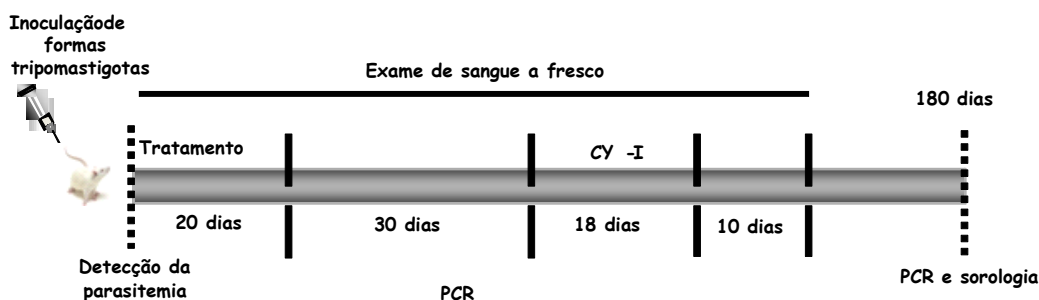


Figura 3: Representação cronológica do experimento utilizado para avaliação de cura. Os camundongos foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com 25 e 50mg/kg de fex-sulfona e 2,5 e 5,0 mg/Kg de E1224 em monoterapia ou em combinação. Foi realizado exame de sangue a fresco antes e após a imunossupressão com Ciclofosfamida e coletas de sangue para PCR e sorologia 30 e 180 dias após o fim do tratamento.

4.4.4. Exame de sangue fresco

Para a realização deste procedimento, 5µL de sangue da veia caudal de cada camundongo foram coletados e a quantificação foi feita pela técnica descrita por Brener (1962).

4.4.5. Extração do DNA e realização da PCR de sangue periférico

A PCR de sangue periférico foi realizada 30 e 180 dias após o fim do tratamento. Coletou-se 200µL de sangue de cada camundongo pelo plexo venoso retro-orbital e adicionados a 35µL de solução de citrato de sódio com concentração de 129mM. O material foi utilizado no mesmo dia. Os 200µL de sangue coletado de cada animal foram transferidos para microtubos de 1,5mL contendo 600µL de Solução de Lise Celular (Wizard® Genomic). Este conteúdo foi homogeneizado por lenta inversão (seis vezes) e mantido a temperatura ambiente por 10 minutos. Os microtubos foram centrifugados por 40 segundos a 14000 rpm e o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta, restando apenas 10-20µL de líquido residual, os quais foram levados ao vórtex por 30 segundos, a fim de haver a ressuspensão das células brancas do sangue. Posteriormente foram adicionados 200µL de solução de lise nuclear (Wizard® Genomic) aos microtubos, os quais foram incubados por 60 minutos em banho-maria a 37°C. Os microtubos foram retirados do banho-maria, e após 10 minutos, quando atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 67µL da solução de precipitação protéica (Wizard® Genomic) aos microtubos, os quais foram homogeneizados em vórtex por 30 segundos e, posteriormente, centrifugados por 4 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante de cada amostra, contendo o DNA, foi transferido para novos microtubos de 0,6mL, contendo 200µL de isopropanol. Os microtubos foram invertidos cerca de 10 vezes e agitados para que houvesse a precipitação do DNA e centrifugados por 90 segundos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µL de etanol 70% seguido de centrifugação por 90 segundos a 14000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o microtubo foi invertido sobre papel absorvente para secagem por cerca de 30 minutos, sendo o DNA reidratado em seguida com 67µL da solução de reidratação (Wizard® Genomic) e incubado a 4°C por 24 horas.

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2µL de DNA genômico (50ng), 0,35µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a repetição de 195 pares de bases (pb) do DNA do *T. cruzi*, TCZ-F 5'-

GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', onde M = A ou C (Invitrogen), e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', (Cummings & Tarleton 2003) o qual amplifica um produto de 182 pb, 5µL de *Sybr®Green PCR Mastermix*, e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 10µL. Separadamente, para cada amostra era também realizada uma reação em duplicata para dosar o TNF- α , utilizado como controle endógeno normalizador contendo 2µL de DNA cgenômico (50ng), 0,50µM de oligonucleotídeos iniciadores TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC-3' (Cummings & Tarleton, 2003), o qual amplifica um produto de 170 pb, 5 µL de “*Sybr® Green PCR Mastermix*”, e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 10 µL. As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (*Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™*), centrifugadas por 2 minutos a 200 x g e levadas ao termociclador *Step One Plus (Applied Biosystems)*. O programa de termociclagem consistia de aquecimento a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 64,3°C por 1 minuto, com aquisição da fluorescência a 64,3°C. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de *melting* com desnaturação inicial a 95°C por 15 segundos, resfriamento a 60°C por 1 minuto e aumento gradual de temperatura de 0,3°C/s até 95°C. Cada placa continha um controle negativo da extração (proveniente de camundongo normal), em duplicata, para sangue, e um controle negativo da PCR, em duplicata, com água no lugar de DNA, para a reação com oligonucleotídeos iniciadores do *T. cruzi* e do TNF- α (Cummings & Tarleton, 2003).

4.4.6. Mortalidade e peso

A taxa de mortalidade foi avaliada a partir do 4º dia pós infecção até o 30º dia pós fim do tratamento, pela observação diária dos animais. Os animais foram pesados no dia do início do tratamento, aos 10 dias, no último dia de tratamento e 10 dias após tratamento. O ganho de peso foi calculado subtraindo-se o peso inicial (primeiro dia de tratamento) do peso final (último dia de tratamento).

4.4.7. Avaliação Sorológica

A coleta de sangue para a avaliação sorológica foi realizada aos 180 dias após o fim do tratamento. Para tanto, foram coletados aproximadamente 500µL de sangue não heparinizado do seio venoso retro-orbital dos camundongos e transferido para tubos eppendorf de 1,5mL, sendo estes centrifugados a 3500rpm por 10 minutos. Os soros foram armazenados em novos tubos e estocados a -80°C. Para a realização da técnica, foram utilizados antígenos da forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*, obtidos de cultivo acelular em meio LIT. Como conjugado foram utilizadas anti-imunoglobulinas de camundongo IgG marcadas com peroxidase (BethylLaboratories, Montgomery, USA).

O ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) foi realizado segundo a metodologia descrita por Voller, *et al.*, (1976), com algumas modificações. O teste foi executado em placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato. Cada poço da placa foi tratado com extrato antigênico de epimastigotas, na concentração definida previamente por titulação (3 µg/mL), diluído em solução tampão carbonato. As placas foram incubadas a 4°C por 18h e após este intervalo de tempo foram bloqueadas com PBS + SFB e incubadas a 37°C. A próxima etapa foi a adição de soro de cada animal, e incubação a 37°C. Posteriormente, foi adicionado o conjugado, diluído em PBS-Tween, conforme titulação prévia, e as placas foram novamente incubadas a 37°C. Finalmente, foi adicionada a solução de substrato (O-fenilenodiamino-OPD, solução de ácido cítrico e H₂O₂) e a reação interrompida com a adição de ácido sulfúrico. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Epoch) com filtro de 490nm. Em cada placa foram adicionados 10 soros controles negativos e quatro controles positivos. A absorbância discriminante, em cada placa, foi calculada tomando-se a média da absorbância dos 10 soros negativos somados a dois desvios padrões.

4.4.8. Análise estatística dos experimentos *in vivo*

Os resultados dos níveis de parasitemia, níveis de anticorpos e peso dos animais foram expressos como a média ± desvio padrão para cada conjunto de dados. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico Tukey de múltipla comparação e considerados significativos quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Resultados *in vitro*

5.1.1 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do fex-sulfona, fex-sulfóxido e ravuconazol e suas combinações utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y

Inicialmente foi avaliado o efeito dos fármacos SfX, SfN e Rv isoladamente sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y do *T. cruzi*. Como controle foi utilizado o benznidazol. A incubação das células infectadas por 72 horas com diferentes concentrações dos fármacos reduziu o número de células infectadas, resultando em valores de IC-50 próximos para ambos os metabólitos do fexinidazol: $14,11 \pm 1,13 \mu\text{M}$ e de $13,23 \pm 2,76 \mu\text{M}$ para o SfX e SfN, respectivamente. A análise *in vitro* da eficácia dos fármacos também confirmou a potente atividade anti- *T. cruzi* do Rv sobre as formas amastigotas, resultando em um IC-50 de $0,08 \pm 0,042 \text{ nM}$ (Figura 4). O valor de IC50 do Bz foi $3,11 \mu\text{M}$.

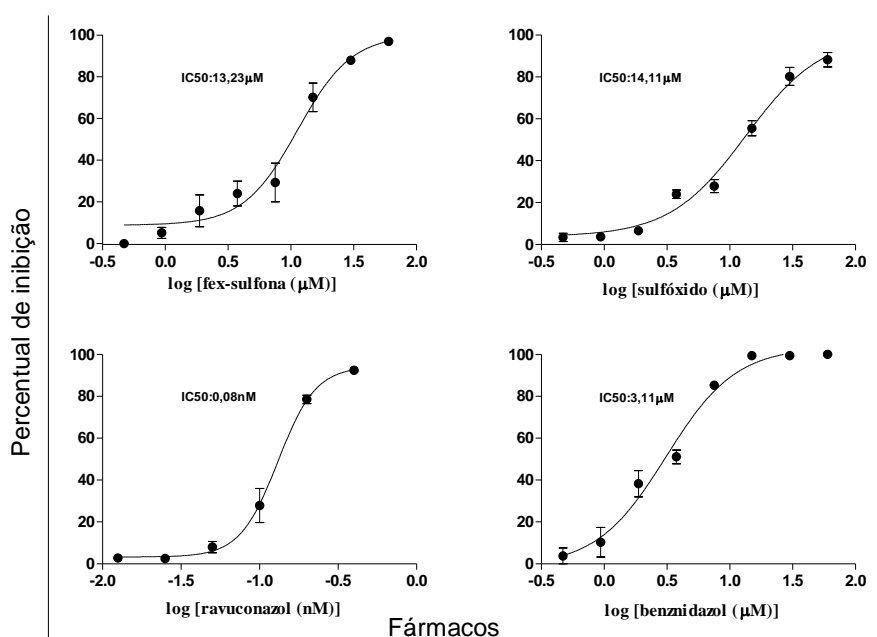


Figura 4: Atividade do fexinidazol-sulfóxido (SfX), fexinidazol-sulfona (SfN), ravuconazol (Rv) e benznidazol (Bz) sobre amastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. 1×10^4 células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de SfX, SfN, Rv e Bz, por 72 horas. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes. O IC-50 foi calculado utilizando-se o software *CalcuSyn*.

5.1.2 Determinação da citotoxicidade dos fármacos avaliados e de suas combinações para células de mamíferos

Para avaliar a toxicidade dos fármacos ravuconazol (Rv), fex-sulfóxido (SfX) e fex-sulfona (SfN) sobre células de mamíferos, foram utilizadas concentrações dos fármacos no mínimo 13 vezes superiores aos valores de IC-50 determinados previamente. Os fármacos foram incubados com células H9c2 e a toxicidade determinada por meio do método colorimétrico baseado na redução da resazurina.

O teste da resazurina foi eficiente em identificar toxicidade, além de não sofrer interferência de nenhuma das drogas avaliadas, visto que não houve redução do corante na presença de fármaco e ausência de células. O percentual de redução das células em DMSO variou em função da concentração utilizada. A utilização de 10% causou a morte de todas as células, visto que quando observadas ao microscópio, estavam em suspensão. Nesse caso, não foi observada redução do corante (Figura 5). Nas concentrações de 5% e 0,3125% foram observados 54% e 73% de redução, respectivamente, valores significativamente menores do que os observados para as células na ausência de DMSO. É válido ressaltar que nos experimentos de avaliação da atividade dos fármacos *in vitro*, a concentração final de DMSO foi de 0,06%, a qual não afeta a proliferação ou infecção das células.

As maiores concentrações de SfX, SfN e Rv, isoladamente, não foram tóxicas para as células, pois percentuais de redução similares foram observados em células não tratadas. Em relação às combinações, foi observada toxicidade apenas quando utilizados SfN + Rv nas maiores concentrações (Figura 5).

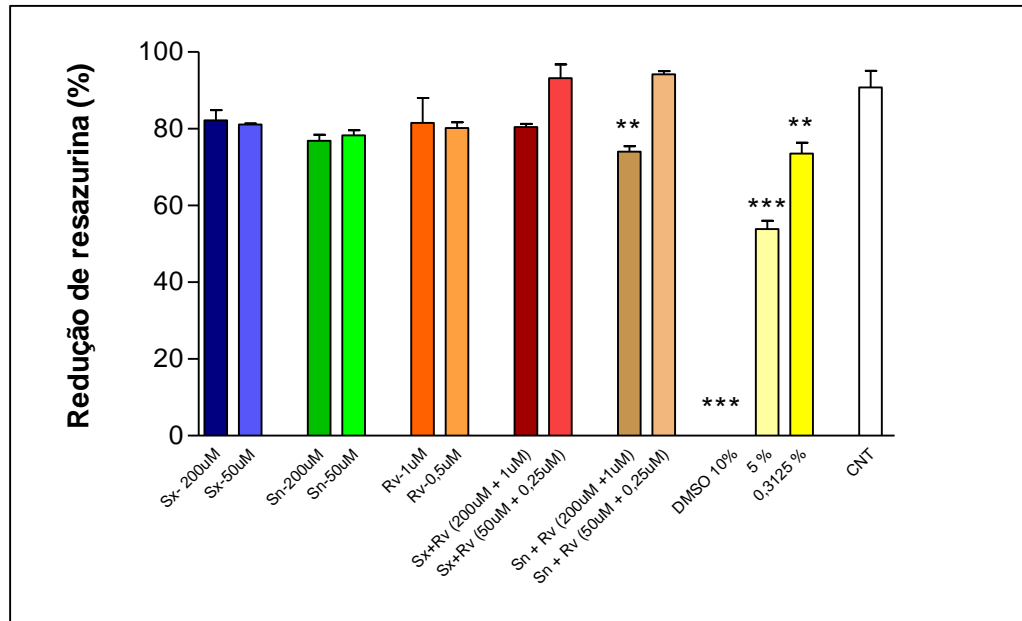


Figura 5: Percentual de redução da resazurina por células H9c2 incubadas por 72 horas com diferentes concentrações de fex-sulfóxido (SfX), fex-sulfona (SfN), ravuconazol, dimetilsulfóxido (DMSO) e com combinações de fex-sulfóxido e ravuconazol (SfX+Rv) e fex-sulfona e ravuconazol (SfN+Rv). A leitura da reação foi feita seis horas após a adição do corante. *** indica diferença significativa, com relação ao controle não tratado, ao nível de $p < 0,0001$.

5.1.3 Determinação da natureza da interação *in vitro* entre fex-sulfona e ravuconazol

Considerando que não foi detectada toxicidade resultante da combinação entre os metabólitos do fexinidazol e Rv, e ainda, que o SfN é o metabólito final responsável pela atividade do fexinidazol, o próximo passo foi avaliar o tipo de interação resultante do uso do SfN quando combinado ao Rv utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*.

As misturas dos fármacos *in vitro* foram feitas usando método de proporções fixas e os dados analisados ao nível da IC-50. A partir dos percentuais de inibição obtidos para as diferentes diluições das diversas misturas, bem como dos fármacos usados isoladamente, foram construídas curvas de dose-resposta (Figura 6).

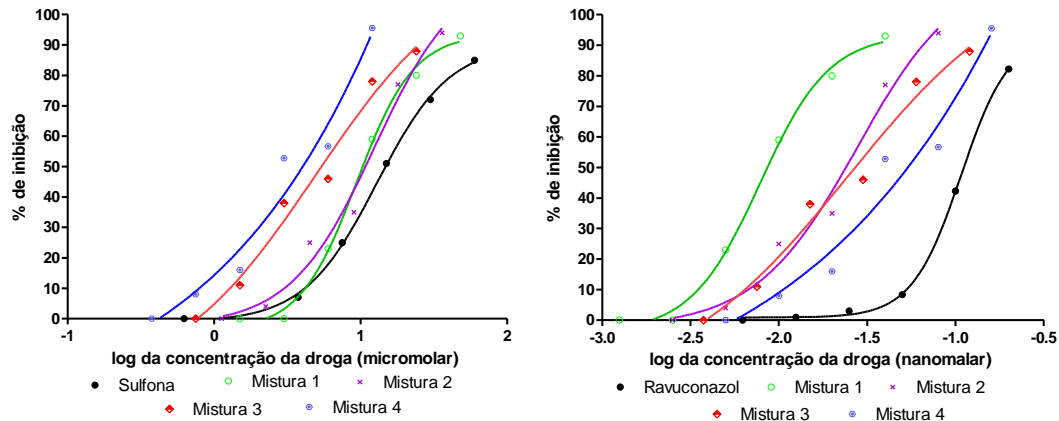


Figura 6: Curvas de dose-resposta representativas da interação *in vitro* entre fex-sulfona e ravuconazol sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. 1×10^4 células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de fex-sulfona e ravuconazol, isoladamente ou em combinação de proporções fixas, por 72 horas. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes. O cálculo de IC-50 foi realizado utilizando-se o *software CalcuSyn*.

Considerando o padrão observado para as curvas de dose-resposta, nota-se que são típicas de interação indiferente ou efeito aditivo entre os dois compostos, pois as curvas obtidas para o SfN e Rv em combinação estão próximas às curvas obtidas para cada fármaco usado isoladamente, especialmente no caso do SfN (Figura 6).

Para confirmar essa observação, os dados foram analisados pelo método de FIC. Os valores de FIC para cada composto em combinação, bem como o somatório das FIC (\sum FIC) estão mostrados na tabela 2. A natureza das interações foi classificada de acordo com a média de \sum FIC; se \sum FIC $\leq 0,5$, interação sinérgica; antagônica quando \sum FIC > 4 ; e indiferente ou aditiva quando \sum FIC $> 0,5$ e ≤ 4 . A combinação entre fex-sulfona e ravuconazol resultou em valores de \sum FIC que variaram de 0,62 a 2,12 (Tabela 2). O menor valor (0,62), foi obtido para a proporção de uma parte de fex-sulfona para 4 partes de Rv, o que indica a possibilidade de redução do metabólito com manutenção da eficácia.

Tabela 2: Efeitos antiproliferativos do fex-sulfona e ravuconazol em combinação no tratamento de células H9c2 infectadas pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*: FICs da IC50.

Fármacos / Misturas	Média das FICs \pm DP - IC-50		FIC-SfN+ FIC-Rv
	FIC SfN	FIC Rv	Σ FICs
SfN (monoterapia)	1	0	1
SfN+Rv (4+1)	2,02	0,10	2,12
SfN+Rv (3+2)	0,63	0,08	0,71
SfN+Rv (2+3)	0,69	0,21	0,9
SfN+Rv (1+4)	0,34	0,28	0,62
Rv (monoterapia)	0	1	1
Médias \pmDP	0,92 \pm 0,75	0,1675 \pm 0,09	1,08 \pm 0,70

O isoblograma, que é a representação gráfica da interação, está representado na figura 7. De maneira similar aos valores observados para FIC, os diferentes pontos indicaram efeito aditivo entre SfN e Rv.

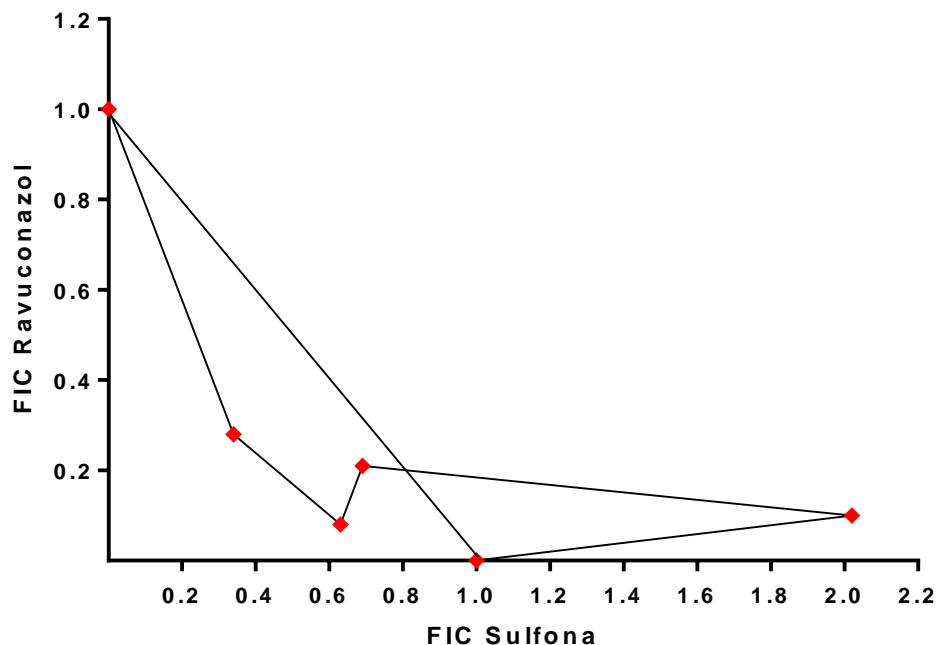


Figura 7– Isoblograma representativo da interação *in vitro* contra amastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Os números na abcissa representam os FICs da IC50 do fex-sulfona e os na ordenada, do ravuconazol. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes.

A avaliação das combinações entre SfN e Rv sobre formas amastigotas de *T. cruzi* mostrou que não há antagonismo entre esses fármacos *in vitro* nas diferentes proporções testadas. Adicionalmente, não foi detectada toxicidade resultante do uso combinado. Esses resultados evidenciaram a importância de estudar essa estratégia farmacológica em modelo *in vivo* de infecção por *T. cruzi*.

5.2. Resultados *in vivo*

Considerando os resultados das avaliações *in vitro*, foi avaliado o efeito *in vivo* das combinações de fex-sulfona (SfN) e E1224 (pró-fármaco do ravuconazol). Estudos anteriores (Bahia *et al.*, 2014a; Diniz *et al.*, dados não publicados) estabeleceram as doses ótimas de E1224 e SfN, 10mg/kg e 100mg/kg, respectivamente. Dose ótima se refere àquela capaz de induzir 100% de cura na infecção murina aguda pela cepa Y de *T. cruzi*, a qual é parcialmente resistente ao fármaco de referência, o benznidazol

(Filardi e Brener, 1987). Considerando esses dados, foram utilizadas metade e um quarto das doses ótimas de cada fármaco para a avaliação da combinação. Assim, camundongos Swiss infectados pela cepa Y de *T. cruzi* foram tratados com SfN (25 e 50 mg/kg) e E1224 (2,5 e 5 mg/kg), administrados isoladamente e em combinação (SfN-25+ E1224-2,5 e SfN-50+E1224- 5mg/kg).

Os camundongos infectados e não tratados apresentaram altos níveis parasitêmicos, com pico aos 8 dias após a infecção, a qual induziu mortalidade em 100% desses animais num prazo de 24 dias. Por outro lado, todos os animais tratados com os diferentes esquemas terapêuticos foram completamente protegidos da mortalidade (Figura 8).

A administração de E1224 nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg e de Bz 100 mg/kg foi eficaz em suprimir a parasitemia a partir do segundo dia de tratamento (Figura 8A). Por outro lado, o tratamento com 25 mg/kg do fex-sulfona não foi capaz de induzir esse mesmo efeito, apesar de levar a uma redução significativa do número de parasitos detectados pelo exame de sangue a fresco em relação ao controle infectado e não tratado (Figura 8B). De forma diferente, quando administrados 50 mg/kg de SfN, o número de formas tripomastigotas observado no dia pico de parasitemia foi significativamente reduzido, sendo detectada supressão da parasitemia em 5/7 animais a partir do 12^o dia de tratamento (Fig 8B). Em relação à terapia combinada, em ambos os grupos tratados (SfN-25mg/kg + E1224-5mg/kg e SfN-50mg/kg + E1224-2,5mg/kg) não foram detectados parasitos no sangue periférico durante todo o período de tratamento (Figura 8C).

Após o fim do tratamento, o efeito positivo das combinações de E1224 e SfN pôde ser verificado considerando os percentuais de reativação da parasitemia encontrados. Nos animais tratados com E1224-5mg/kg em combinação com SfN 25mg/kg, houve reativação da parasitemia em apenas um animal (14%), enquanto naqueles tratados com essas doses em monoterapia, a reativação natural da parasitemia ocorreu em 43% (3/7) do grupo e nos animais tratados com SfN 25mg/kg a parasitemia foi persistentemente positiva (Figura 8C).

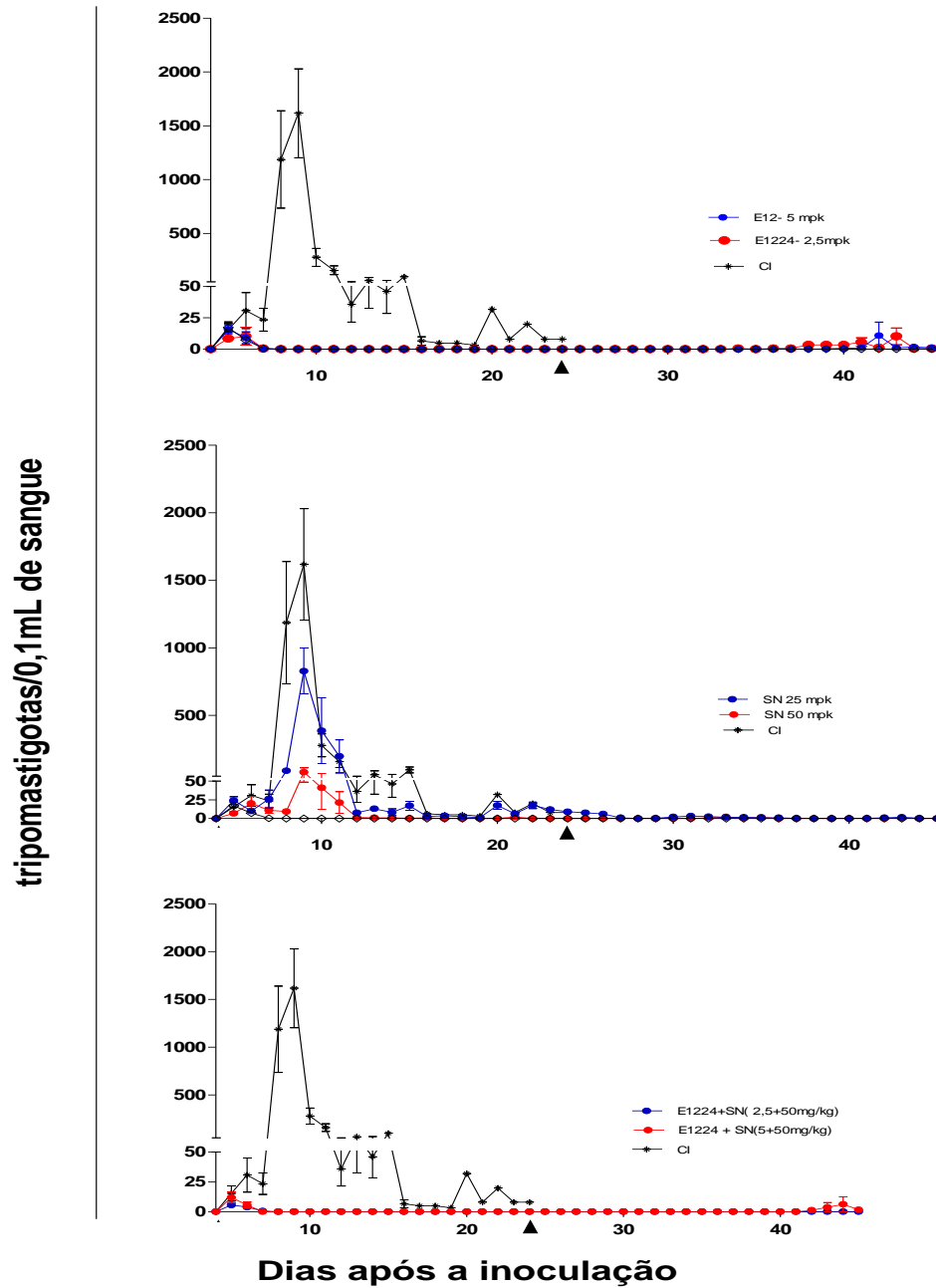


Figura 8: Eficácia do E1224 e fex-sulfona (SfN) em suprimir a parasitemia de camundongos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. (A) parasitemia dos grupos tratados com as monoterapias de E1224 2,5 e 5,0 mg/Kg; (B) parasitemia dos grupos tratados com as monoterapias de fex-sulfona 25 e 50 mg/Kg; (C) parasitemia dos grupos tratados com as combinações 2,5mg/Kg+50mg/Kg e 5,0mg/Kg+25mg/Kg de E1224 e fex-sulfona. Média e desvio padrão da parasitemia dos animais inoculados pela via intraperitoneal com 5×10^3 formastripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados por 20 dias consecutivos, a partir do 4º dia de infecção com E1224; CI–grupo controle infectado e não tratado. Triângulos indicam último dia de tratamento.

Quando utilizados 50mg/kg de SfN, foi detectada reativação natural da infecção em 100% dos animais após o tratamento. Por outro lado, quando essa dose foi associada a 2,5mg/kg de E1224, houve reativação da infecção, induzida pela imunossupressão, em apenas 1 animal (14%). Esses dados mostram um efeito positivo resultante da associação dos fármacos na redução da carga parasitária, visto que nos camundongos tratados com E1224 2,5mg/kg em monoterapia houve reativação natural em 4/7 animais (57%). Os tratamento com a dose padrão de Bz, 100 mg/kg, preveniu a reativação da parasitemia em 6/7 animais.

Adicionalmente, foi avaliado o peso de todos os animais durante e após 10 dias do fim do tratamento. Foi detectada uma redução significativa do peso dos animais infectados e não tratados, que coincide com a parasitemia elevada. Em todos os animais tratados, o ganho de peso foi similar aos animais não infectados durante todo o período de tratamento, indicando que os tratamentos não induzem toxicidade e ao contrário preveniram a perda de peso. Apenas nos camundongos tratados com SfN 25mg/kg houve uma redução significativa do peso detectada no último dia de tratamento quando comparado aos animais não infectados. Provavelmente, essa redução no ganho de peso foi devida à infecção, visto que nesses animais não foi observada supressão da parasitemia. Entretanto, após o término do tratamento, todos os grupos tratados apresentaram ganho de peso (Figura 9).

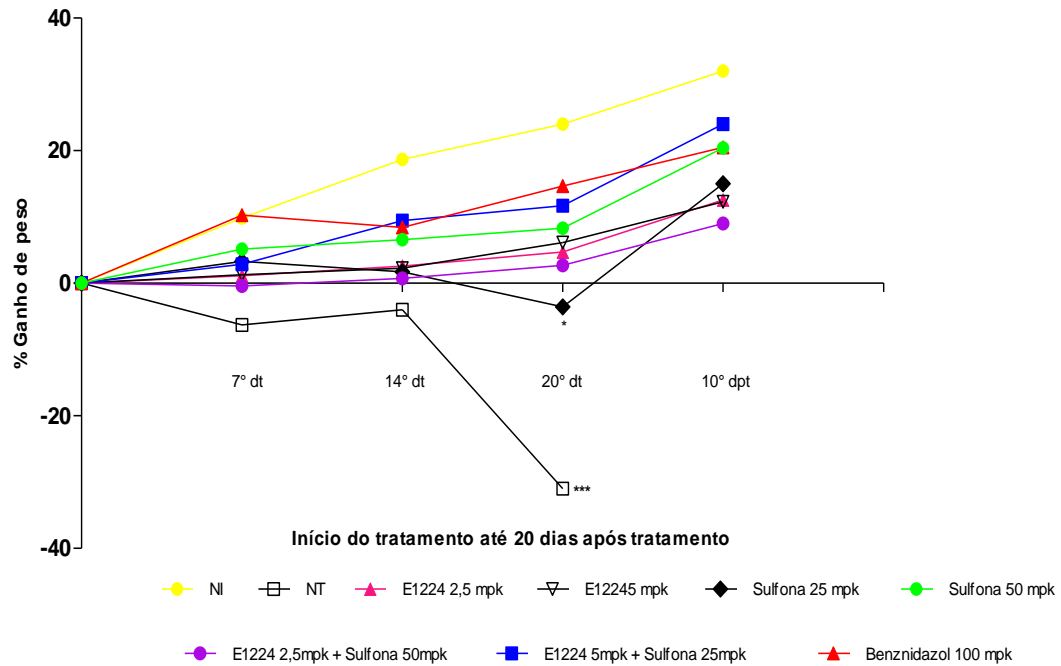


Figura 9: Percentual de ganho de peso observado em animais inoculados com a cepa Y do *Trypanosoma.cruzi* tratados com: 2,5 e 5,0 mg/kg de E1224; 25 e 50 mg/kg de fex-sulfona; as combinações (SfN-25mg/kg + E1224-5mg/kg e SfN-50mg/kg + E1224-2,5mg/kg) e benznidazol 100mg/kg (Bz) a partir do 1º dia de tratamento, durante 20 dias consecutivos e até 10 dias após o fim do tratamento. mg/kg-mg/quilograma de peso corporal. $p < 0,0005^{***}$

A tabela 3 resume os dados de mortalidade e reativação da parasitemia e indica os resultados dos ensaios de *PCR* realizados após extração do DNA de amostras de sangue coletadas 30 e 180 dias após o tratamento. A redução da carga parasitária evidenciada pela supressão da parasitemia foi confirmada pelos índices reduzidos de falha terapêutica observados nos camundongos tratados com as diferentes combinações quando comparadas às monoterapias. Esses percentuais de cura são comparados com os observados para as monoterapias de E1224, já que os tratamentos com o SfN não induziram cura. Foi identificada cura parasitológica, de acordo com os parâmetros estabelecidos, em 28,7% e 42,8% dos animais tratados com E1224 2,5mg/kg e 5mg/kg, respectivamente. De forma interessante, quando essas doses foram associadas ao metabólito SfN, observou-se 85,7% de cura. Por outro lado, o tratamento com Bz na dose de 100mg/Kg, esse percentual foi de 66,7% (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado dos testes realizados no controle de cura dos animais infectados com a cepa Y e tratados com E1224 e o metabólito fex-sulfona do fexinidazol em monoterapia ou em combinação por 20 dias consecutivos. ¹

Grupos experimentais/dose	Número de sobreviventes/ Número total de animais	Numero de ESF negativo ² / Número de animais	Número de amostras de sangue com PCR positivo ³ / número de animais	Total de testes negativos/número de animais (% de cura)
Controle não infectado	6/6	6/6	0/6	6/6
Controle infectado	0/7	0/7	NR ⁵	0/7
E1224/2,5mg/kg	7/7	3/7	1/3	2/7 (28,7%)
E1224/5,0mg/kg	7/7	4/7	1/4	3/7 (42,8%)
Fex-sulfona/25mg/kg	7/7	0/7	NR ⁶	0/7 (0%)
Fex-sulfona/50mg/kg	7/7	0/7	NR ⁶	0/7 (0%)
E1224/2,5mg/kg + Fex-sulfona/50mg/kg	7/7	6/7	0/6	6/7 (85,7%)
E1224/5mg/kg + Fex-sulfona/25mg/kg	7/7	6/7	0/6	6/7 (85,7%)
Benznidazol/100mg/kg	6/6	5/6	1/5	4/6 (66,7%)

¹Camundongos Swiss fêmeas (n=7), pesando 20 a 24 g foram inoculados com 5×10^3 tripomastigotas (cepa Y) O tratamento foi iniciado 4 dias após a inoculação.

² ESF – exame de sangue a fresco realizado antes e após imunossupressão com ciclofosfamida

³ qPCR foi realizado no primeiro e no sexto mês após o tratamento

⁵ Todos os camundongos morreram antes do 30º dia após a inoculação.

⁶ NR - Todos os animais tiveram resultados positivos no exame de sangue a fresco

A fim de avaliar o impacto do tratamento na resposta imune humoral, foram dosados os níveis de anticorpos da classe IgG anti-*T.cruzi* 180 dias após o tratamento. Quando comparados os níveis de IgG encontrados no soro dos animais tratados com as drogas em monoterapia não houve diferença em função da utilização de metade ou ¼ da dose ótima. Em relação à administração das combinações, foi observada redução significativa nos níveis de IgG detectados nos animais tratados com a combinação SfN-25mg/kg+ E1224-5mg/kg quando comparados com o grupos tratados com fex-sulfona isoladamente, mesmo utilizando a dose mais alta, 50mg/kg. Os resultados dessas dosagens nos soros dos animais foram concordantes com aqueles obtidos na avaliação parasitológica (Figura 10).

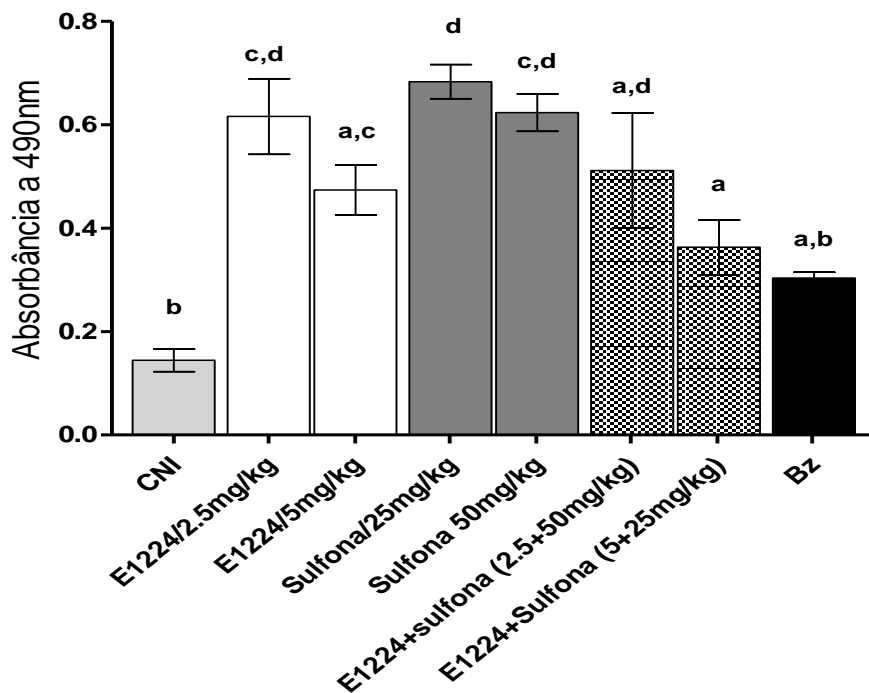


Figura10: Níveis de anticorpos da classe IgG detectados no soro dos animais (180 dias após o tratamento) infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com E1224 e fex-sulfona em monoterapia ou em combinação.

Os resultados apresentados, avaliados de forma conjunta, mostram que o tratamento com as diferentes doses de E1224 e SfN, administradas em combinação, induzem a uma maior redução da carga parasitária em relação às mesmas doses administradas isoladamente. Considerando que as subdoses de sulfona não são suficientes para

induzirem cura isoladamente, pode-se sugerir que o SfN tem a capacidade de potenciar os efeitos de subdoses de E1224 na infecção murina por *T. cruzi*, apesar do encontro de interação indiferente *in vitro*.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

De acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (CBDC, 2005), o tratamento de primeira escolha para a doença de Chagas deve ser realizado com benznidazol, na dose de 5 a 7mg/Kg de peso, por 60 dias. A terapêutica é recomendada na doença congênita, fase aguda, fase crônica recente e quando há reagudização em consequência de imunossupressão. Essas recomendações são baseadas em diversos estudos que demonstraram que, em geral, quanto antes o tratamento etiológico é instituído, maiores as chances de sucesso (para revisão, ver Guedes *et al.*, 2011). Em relação ao tratamento da fase crônica tardia, a qual acomete atualmente cerca de 8 milhões de indivíduos, evidências atuais baseadas em estudos experimentais e clínicos, indicam que o tratamento deve ser oferecido a todos os indivíduos infectados por *T. cruzi*, exceto para aqueles com doença cardíaca e/ou digestiva avançada. De qualquer forma, ainda não há indicação clara de tratamento em larga escala dos casos crônicos na perspectiva de programas de saúde pública no Brasil (CBDC, 2005). Isso se deve aos baixos índices de cura parasitológica observados no tratamento da fase crônica (Ferreira, 1990; Viotti, 2000; Lauria-Pires, 2000; Suasnábar, 2000; Braga, 2000; Cançado, 2002) e à incerteza da capacidade do benznidazol em interferir nas lesões causadas pela infecção (Andrade *et al.*, 1985; Garcia *et al.* 2005).

Considerando a eficácia variável do tratamento com benznidazol, o longo tempo de administração necessário e ainda as reações adversas decorrentes do tratamento, diferentes estratégias têm sido utilizadas na busca de alternativas terapêuticas, incluindo: i) otimização da terapêutica atual, por meio de reformulação dos fármacos de referência, bem como alteração da posologia; ii) introdução da terapia de combinação; e iii) identificação de novas drogas (Espuelas *et al.*, 2012; Bahia *et al.*, 2014b).

A terapia de combinação de fármacos, que foi abordada no presente estudo, é atualmente a estratégia mais promissora para o tratamento da doença de Chagas. Há várias razões que fundamentam a potencial utilização dessa estratégia: a associação de diferentes medicamentos pode possibilitar aumento de eficácia; redução das doses ou do tempo de tratamento, resultando em menos efeitos tóxicos e ainda redução dos custos. Além disso, no caso de combinações usando diferentes classes farmacológicas, o tratamento pode retardar o aparecimento de resistência do patógeno aos fármacos (Chou e Talalay, 1984; Chou 2010; Fivelman *et al.*, 2004; Espuelas *et al.*, 2012).

Nesse estudo foi avaliado o efeito da terapia de combinação utilizando fármacos com reconhecida atividade anti-*T. cruzi*: os metabólitos do fexinidazol, um derivado nitroimidazólico recentemente avaliado em estudos pré-clínicos e o ravuconazol (ou seu pró-fármaco, E1224), um derivado azólico que apresenta potente efeito tripanocida. Inicialmente, foram realizados experimentos *in vitro* com os dois metabólitos do fexinidazol, fex-sulfona e fex-sulfóxido e o ravuconazol a fim de identificar a natureza da interação entre esses fármacos. A linhagem celular H9c2 foi escolhida para essa avaliação, visto que é altamente susceptível à infecção por *T. cruzi* e expressa múltiplos genes CYP em níveis comparáveis aos expressos naturalmente em cardiomiócitos, permitindo que ela seja um bom modelo para estudos que envolvam a atividade metabólica cardíaca (Zordoky e El-Kadi, 2007). Os valores de IC-50 obtidos para cada fármaco isoladamente foram concordantes com os descritos na literatura. O Rv apresentou IC-50 de $0,08 \pm 0,042$ nM, semelhante ao valor observado por Urbina *et al.* (2003b) e Moraes *et al.* (2014), que demonstraram que esse derivado azólico é ativo contra o *T. cruzi* em escala nano a subnanomolar. A atividade de ambos os metabólitos, SfX e SfN, se deu em escala micromolar e foi semelhante à descrita por Moraes *et al.* (2014) e Bahia *et al.* (2014), utilizando diferentes tipos celulares. Adicionalmente, os valores de IC-50 do benznidazol foram concordantes com os obtidos por outros autores (Luna *et al.*, 2009; Romanha *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2012). A diferença na potência dos fármacos *in vitro* já era esperada e está relacionada à classe farmacológica. Em geral, nos experimentos de quimioterapia anti-tripanosomatídeos valores de IC-50 na escala micromolar são obtidos para derivados nitroheterocíclicos, a exemplo do benznidazol e nifurtimox (Neal *et al.*, 1988; Romanha *et al.*, 2010; Torrelle *et al.*, 2010), enquanto os derivados azólicos ativos contra os parasitos, como ravuconazol e posaconazol, apresentam atividade em concentrações significativamente inferiores (Molina *et al.*, 2000; Urbina *et al.*, 2003).

Antes de prosseguir para a determinação do efeito *in vitro* dos compostos quando combinados, foi avaliada a citotoxicidade do Rv e metabólitos quando incubados com células H9c2, isoladamente ou em combinações. Foi observado que a utilização de concentrações no mínimo 13 vezes superiores aos valores de IC-50 de cada fármaco não induziu toxicidade. Esse resultado corrobora aqueles obtidos em outros estudos (Toreele *et al.*, 2010; Wyllie *et al.*, 2013), que encontraram índices de seletividade ($IC-50_{célula}/IC-50_{parasito}$) elevados para ambos os metabólitos, indicando

ausência de toxicidade para células de mamíferos. Adicionalmente, Tweats *et al.*, (2012) mostraram que o fexinidazol e seus metabólitos não induzem genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. Em relação ao Rv, valores de até 1µM, isto é, mais de 12500 vezes superiores ao valor de IC-50, não interferiram na viabilidade das células. Diversos estudos já haviam demonstrado a ausência de toxicidade desse derivado azólico *in vitro* (Urbina *et al.*, 2003b; Moraes *et al.*, 2014) e segurança *in vivo* (Urbina *et al.*, 2003b; Diniz *et al.*, 2010; Watt *et al.*, 2013). Adicionalmente, o Rv foi bem tolerado em humanos saudáveis em doses única (Olsen *et al.*, 2000) e múltiplas (Mikamo *et al.*, 2002).

Drogas que se apresentam seguras quando utilizadas isoladamente podem vir a interagir entre si e induzir toxicidade. Considerando a ausência de toxicidade *in vitro* dos compostos isoladamente, foi avaliado se o fato de combinar essas drogas induziria redução na proliferação das células. Não foi observada interação entre esses fármacos no sentido de potenciar efeitos tóxicos sobre células de mamíferos. Quando a incubação foi feita utilizando as maiores concentrações de SfN e Rv (200 µM + 1 µM), houve diminuição da proliferação celular, provavelmente devido às altas concentrações de fármacos. Por outro lado, essa mesma combinação, porém usando metade da concentração não induziu qualquer toxicidade, assim como as combinações de SfX e Rv.

Considerando a atividade dos fármacos *in vitro*, com valores de IC-50 na faixa de sub-nanomolar a micromolar e ainda a ausência de toxicidade resultante das combinações, foi avaliada a natureza da interação entre as diferentes classes farmacológicas sobre a infecção por *T.cruzi in vitro*. Estudos farmacocinéticos demonstraram (Brun *et al.*, 2011; Bahia *et al.*, 2014a) que fex-sulfona é metabólito final e responsável pela atividade do fexinidazol *in vivo*; ou seja, após administração oral de fexinidazol ou fex-sulfóxido, esses são convertidos no derivado fex-sulfona, o metabólito ativo. Ainda, recentemente Bahia *et al.*, (2014a) demonstraram que SfN apresenta níveis plasmáticos sustentados superiores aos valores de IC-50 determinados *in vitro*. Levando em conta esses dados e ainda que a avaliação *in vitro* orientaria os estudos em modelo animal, o metabólito fex-sulfona foi escolhido para as avaliações subsequentes.

A classificação da natureza da interação entre diferentes fármacos em uma combinação pode ser feita de diferentes maneiras (Berenbaum, 1978; Hallander *et al.*, 1982; Tallarida, 2002; Chou *et al.*, 1984; Chou, 2010; Jonker *et al.*, 2005). Neste estudo foi utilizado o método de proporções fixas modificado (Fivelman *et al.*, 2004), sendo a natureza da interação classificada por meio da FICs (concentração inibitória fracionada) (Fivelman *et al.*, 2004) e representada isobolograficamente. O método de FICs leva em conta o valor de IC-50 de cada fármaco isoladamente e em cada uma das diversas misturas ou combinações. Ou seja, considera a atividade da proporção de cada uma das drogas na combinação. Ao final da análise é feito o somatório das FIC (Σ FICs) de ambos os fármacos detectadas para as 4 misturas. A média desses valores de Σ FICs é utilizada para classificar a natureza da interação. Existem duas formas de classificar a natureza da interação em função desse parâmetro: alguns autores (Chou e Talalay, 1984; Rodrigues *et al.*, 2014) utilizam o valor de Σ FICs igual a 1 como ponto de corte; nesse caso, se Σ FICs for menor que 1 há interação sinérgica, se maior que 1, antagônica e caso igual a 1, há ausência de interação, o mesmo que efeito aditivo. Entretanto, tem crescido o consenso de que não é racional fazer interpretação acerca da natureza da interação em torno dos valores próximos de 1; tirar conclusões que interações são aditivas, antagônicas ou mostram sinergismo a partir de dados de Σ FIC ligeiramente acima ou abaixo de 1,0 parece dar uma interpretação positiva ou negativa sobre as conclusões que, dentro dos limites do erro experimental, realmente indicam apenas ausência de interação entre os compostos (Odds, 2003). Nesse sentido, atualmente os autores têm sido estimulados a definir a natureza da interação como sinérgica se Σ FIC $\leq 0,5$; antagônica se Σ FIC > 4 e ausência de interação se $0,5 < \Sigma$ FIC ≤ 4 (Seifert *et al.* 2006, Planer *et al.*, 2014.). Essa classificação foi utilizada no presente estudo. Os resultados demonstraram que não há interação entre fex-sulfona e Rv *in vitro*, mas apenas um somatório da atividade de ambos, o que caracteriza efeito aditivo. Os valores de Σ FIC encontrados para as diferentes misturas variaram de 0,62 a 1,2, com média de $1,08 \pm 0,70$ (Tabela 2).

Considerando os estudos de combinações de fármacos em diversas patologias (a exemplo de câncer, HIV, infecções bacterianas e fúngicas, malária) há um número muito reduzido de trabalhos que avaliaram combinações de fármacos no tratamento da infecção por *T. cruzi*. A maioria deles envolveu a associação de compostos inibidores da biossíntese de ergosterol do parasito, resultando, em geral, em efeito sinérgico. Urbina

et al. (1988; 1993) e Santa Rita *et al.*, (2005) demonstraram que inibidores da biossíntese do ergosterol que atuam em diferentes pontos dessa via biossintética, como o terbinafina, lovastatina e análogos de fosfolípídeos podem potencializar o efeito tripanocida do cetoconazol *in vitro*, resultando em interação sinérgica. Ainda, a amiodarona, um fármaco antiarrítmico utilizado no tratamento de pacientes cardiopatas, incluindo chagásicos, potencializa o efeito tripanocida do posaconazol *in vitro* (Benaim *et al.*, 2006; Veiga-Santos *et al.*, 2012). Quando avaliadas em modelo murino de infecção por *T. cruzi*, essas mesmas combinações possibilitaram a redução de doses ou aumento da eficácia do tratamento, indicando que drogas que interagiram de maneira sinérgica *in vitro* resultaram em efeito positivo *in vivo*.

A mistura de SfN e Rv apresentou efeito aditivo *in vitro* na eliminação de formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Considerando esse resultado, foi avaliado o efeito da combinação de SfN e Rv no tratamento da fase aguda da infecção de camundongos pela cepa Y de *T. cruzi* quando comparado ao efeito dos fármacos administrados em monoterapia. A translação *in vitro-in vivo* de combinações de fármacos não é ainda bem estabelecida. A seleção de doses e proporções ótimas de cada fármaco, mesmo nos casos de efeito preditivo *in vitro* demonstrado, permanece um desafio. Deste modo, a escolha das doses para o tratamento foi feita levando em consideração os dados de Bahia *et al.*, 2014 e Diniz *et al.* (dados não publicados), que definiram as doses ótimas (curam 100%) de SfN (100mpk) e E1224 (10mpk) para o tratamento da infecção murina pela cepa Y de *T. cruzi*. Foram utilizadas metade e um quarto dessas doses, a fim de possibilitar a identificação de interação entre os fármacos. A escolha das proporções de cada droga levou em consideração os resultados dos experimentos *in vitro*. Apesar do resultado global indicar efeito aditivo, a mistura que continha a menor proporção de SfN e maior proporção de Rv (1:4 partes, respectivamente), apresentou o valor de Σ FIC mais próximo entre o limite entre sinergismo e aditividade (0,62). Por outro lado, quando a maior concentração de fex-sulfona foi misturada à menor de Rv, o mais alto valor de Σ FIC (2,12) foi obtido. Nesse sentido, optamos por avaliar essas duas proporções; um grupo de animais foi tratado com 50mpk de SfN e 2,5mpk de E1224 e outro grupo tratado com 25mpk de SfN e 5mpk de E1224. As mesmas doses foram utilizadas em monoterapia.

O efeito positivo da terapia combinada pôde ser observado pela redução da carga parasitária observada nesses grupos quando comparados à administração das

mesmas doses em monoterapia. Nos animais que receberam E1224- 2.5mpk ou SfN- 50mpk isoladamente, houve reativação natural da parasitemia em 57% e 100% camundongos, respectivamente, a partir do 9º dia após o término do tratamento. Por outro lado, não foi detectada reativação natural da parasitemia quando utilizadas essas mesmas doses em combinação. Somente após a imunossupressão, detectaram-se parasitos no sangue periférico em 1/7 (14%) animais. Efeito semelhante foi observado quando utilizados E1224-5mpk + SfN- 25mpk; a administração de subdoses de SfN em monoterapia não foi capaz de levar à supressão da parasitemia e nos animais tratados com E1224 houve reativação natural, após o 16º dia pós-tratamento, em 3/7 (42%) camundongos. De forma interessante, quando essas mesmas doses foram associadas, detectou-se parasitos no sangue periférico de apenas 1 animal, evidenciando o benefício da terapia combinada.

A potente redução da carga parasitária foi confirmada pelos níveis reduzidos de falha terapêutica nos animais que receberam o tratamento combinado. A avaliação dos testes parasitológicos em conjunto com a PCR revelou que, enquanto nenhum dos animais tratados com SfN (em ambas as doses) foi curado e 2/7 (28,7%) e 3/7 (42,8%) dos animais tratados com E1224 nas doses de 2,5mpk e 5,0 mpk, respectivamente, foram curados, verificou-se cura em 85,7% dos animais tratados com cada combinação, mostrando claramente o sucesso da estratégia utilizada e sugerindo interação entre os fármacos *in vivo*.

Os níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* detectados aos 180 dias após o tratamento mostraram uma tendência de redução no caso de sucesso terapêutico, confirmando a redução da carga parasitária. Estes resultados estão de acordo com os dados de Garcia *et al.*, (2005) que demonstraram uma redução dos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* nos animais tratados com Bz. A resposta imune humoral exerce um importante papel no controle da parasitemia e na resistência à infecção por *T. cruzi* (Krettli e Brener, 1976). Imunoglobulinas G anti-*T. cruzi* são produzidas logo no início da fase aguda da doença e reagem principalmente com moléculas de superfície das formas tripomastigotas, sendo importantes no controle do parasitismo. Assim, quando analisados de forma conjunta com a negatização dos testes parasitológicos, os menores níveis de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* sugerem sucesso terapêutico (Cançado, 1973, Dias e Coura 1997). Por outro lado, um longo tempo de avaliação pode ser necessário para a diminuição dos níveis de anticorpos abaixo do valor discriminante, mesmo nos casos de cura parasitológica.

De forma geral, os resultados da avaliação *in vivo* mostraram que a associação de subdoses de SfN e E1224 possibilitou aumento da eficácia do tratamento quando comparada à obtida com cada fármaco isoladamente. De forma interessante, além de garantir esse aumento da eficácia em relação às subdoses, o percentual de cura obtido (85,7%) com o tratamento combinado foi próximo ao observado quando utilizadas as doses ótimas de cada fármaco (100%) (Diniz *et al.*, dados não publicados; Bahia *et al.*, 2014a). Dessa forma, houve um grande benefício da associação de SfN e E1224 *in vivo*, devido à possibilidade da redução das doses de cada composto, confirmando os resultados obtidos *in vitro*, que mostraram a presença de efeito aditivo entre os dois compostos.

O valor preditivo das combinações “aditivas” no que diz respeito à translação para avaliações *in vivo* ainda não está bem estabelecido nos estudos de quimioterapia experimental da doença de Chagas, provavelmente devido ao reduzido número de trabalhos que abordam esse assunto. Em geral, combinações sinérgicas *in vitro* induziram efeito positivo *in vivo* (Urbina, 1988; Santa-Rita, 2005; Benaim, 2006). No entanto, Planer *et al.*, (2014), ao avaliarem 9 combinações de fármacos com diferentes mecanismos de ação, identificaram, *in vitro*, que 4 delas eram sinérgicas e 5 eram aditivas. Ao testarem as mesmas combinações *in vivo*, o melhor efeito foi atribuído a uma combinação aditiva, cujo valor médio de Σ FIC era 0,645. Os autores sugeriram que combinações aditivas próximas ao limite do sinergismo podem levar a efeitos mais favoráveis *in vivo* devido a interações biológicas entre os fármacos no organismo. No entanto, no presente estudo foram avaliadas combinações que apresentaram valores de Σ FIC, para cada mistura, mais próximos (0,62) ou mais afastados (2,12) do limite de sinergismo *in vitro*, com uma média global de Σ FIC igual a 1,08, indicando efeito aditivo (Tabela 2). E combinações desses mesmos fármacos *in vivo* induziram efeito positivo sobre a infecção murina. Deste modo, pode-se sugerir que combinações aditivas *in vitro* devem ser avaliadas *in vivo* considerando a possibilidade de interações *in vivo* favoráveis.

Ainda não foi estudado se há uma interação farmacodinâmica ou farmacocinética entre SfN e E1224 em camundongos ou mesmo sinergismo *in vivo* sobre os parasitos. Jia *et al.*, (2009) descreveram as várias possibilidades de interação ou de potenciação de efeito entre dois fármacos. Dentre essas possibilidades incluem-se interações farmacodinâmicas devido a ações complementares ou facilitadoras, envolvendo diferentes alvos em vias relacionadas ou não e interações farmacocinéticas,

que influenciam no metabolismo ou permeação dos fármacos. Moreira-da Silva *et al.*, (2012) identificaram que interações farmacocinéticas foram responsáveis pelo sinergismo observado entre o itraconazol, um inibidor da biossíntese de ergosterol, e o benznidazol no tratamento da infecção murina por *T. cruzi*. O itraconazol permitiu maior biodisponibilização do benznidazol, cuja atividade foi conseqüentemente aumentada. Esse pode ser um provável mecanismo de interação associado aos resultados promissores observados com a utilização de combinações de derivados azólicos e o benznidazol na quimioterapia experimental da doença de Chagas. Araújo *et al.*, (2000) avaliaram a eficácia da terapia de combinação de benznidazol e cetoconazol em camundongos infectados por diferentes cepas de *T. cruzi*. Os autores encontraram um efeito positivo sobre a infecção pelas cepas CL e Y, o que não foi observado nos animais infectados pela cepa Colombiana. Mais recentemente, Cencig *et al.*, (2012) e Diniz *et al.*, (2013) demonstraram que a combinação benznidazol/posaconazol induziu índices de cura parasitológica maiores que quando utilizados em monoterapia, indicando sinergismo entre eles. Bustamante *et al.* (2014), ao associarem de maneira seqüencial, benznidazol e posaconazol, identificaram eficácia terapêutica superior utilizando um menor número de doses de cada fármaco.

Além do aumento de eficácia terapêutica obtido com a utilização de combinações, o fato de associar fármacos com diferentes mecanismos de ação é de grande importância para evitar ou retardar o surgimento de resistência do patógeno ao tratamento (Chou, 1984). O fex-sulfona é um nitroimidazol; o grupo nitro presente no fex-sulfona é metabolizado por nitroredutases, formando espécies biologicamente ativas que interferem na biossíntese de macromoléculas do parasito (Wilkinson *et al.*, 2011). A eficácia desse fármaco em monoterapia já foi demonstrada em estudos anteriores contra diversos tripanosomatídeos (Torreele *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2011; Wyllie *et al.*, 2013; Bahia *et al.*, 2014a). O E1224 é um pró-fármaco do Rv, um derivado azólico, desenvolvido originalmente como anti-fúngico. Esse composto atua inibindo a biossíntese de ergosterol, que é um esterol de membrana essencial para a proliferação e sobrevivência de *T. cruzi*.

Devido à excelente atividade anti-parasitária tanto do E1224 quanto do fexinidazol (que é o precursor do metabólito fex-sulfona), ambos os fármacos estão sendo estudados em ensaios clínicos para determinação de segurança e eficácia. O fexinidazol está sendo avaliado em ensaio clínico de fase II para o tratamento da tripanossomíase africana (Tarral *et al.*, 2014). Os resultados até agora obtidos

permitiram concluir que o fexinidazol pode ser administrado com segurança a indivíduos sadios e que esse é um candidato em potencial para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos. Considerando que o fexinidazol foi administrado em altas doses (até 3600mg) e que a administração de doses menores do metabólito ativo, fex-sulfona poderia resultar em efeito similar ou superior ao do fexinidazol (Bahia *et al.*, 2012; Bahia *et al.*, 2014a), o perfil de segurança e tolerabilidade do metabólito fex-sulfona é bastante promissor. Já o E1224 foi desenvolvido por meio de uma parceria entre a DNDi e a Eisai, uma indústria farmacêutica. Essa parceria envolveu o compromisso, por parte da Eisai, em fornecer o fármaco a um preço acessível caso utilizado para o tratamento da doença de Chagas. O estudo clínico para avaliação do E1224 foi iniciado em 2011, na Bolívia. Foi demonstrado que apesar de apresentar perfil favorável de segurança e toxicidade e ter sido eficaz na supressão da parasitemia durante o tratamento, houve falha terapêutica em cerca de 90% dos pacientes tratados, demonstrada por PCR (Faustino Torrico no *Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, November 2013*). Esses dados mostraram que o E1224 não foi eficaz no tratamento da doença de Chagas quando utilizado em monoterapia; logo, novas alternativas para administração necessitam ser consideradas.

Assim como o E1224, nos últimos anos diversas novas drogas foram avaliadas em estudos pré-clínicos. Entretanto, um número extremamente limitado foi eficaz em induzir cura parasitológica em modelos experimentais *in vivo* (Bahia *et al.*, 2014b). Esses dados evidenciam que é necessário buscar novas estratégias de tratamento ou mesmo protocolos alternativos utilizando esse número limitado de fármacos ativos, ao invés de desconsiderá-los. Considerando os resultados obtidos no presente estudo, do efeito positivo resultante da associação de SfN e Rv e ainda, a administração por via oral de ambos fármacos, os dados de segurança para o fexinidazol e E1224 em ensaios clínicos e o fato de pertencerem a diferentes classes farmacológicas, sugere-se que essa combinação apresenta grande potencial no tratamento da doença de Chagas humana. Nesse sentido, os estudos pré-clínicos devem ser ampliados a fim de comprovar a eficácia dessa estratégia no tratamento da infecção crônica e /ou causada por cepas resistentes ao benznidazol.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O ravuconazol, fex-sulfóxido e fex-sulfona apresentaram potente atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*;

- Os metabólitos do fexinidazol e o Rv não resultaram em efeitos tóxicos para células H9c2 quando utilizados isoladamente ou em combinações;
- Fex-sulfona e ravuconazol atuam de maneira aditiva na eliminação de formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, quando utilizadas células H9c2; portanto, não há interação entre esses fármacos *in vitro* no modelo experimental utilizado;
- A combinação de subdoses de E1224 (pró-fármaco do ravuconazol) com fex-sulfona foi mais eficaz em induzir cura parasitológica quando comparada à administração dos fármacos em monoterapia nas mesmas doses;
- A terapia combinada usando doses sub-ótimas (5 + 25 mg/Kg) resultou em índices de cura próximos aos obtidos com a administração de doses ótimas de cada fármaco em monoterapia;

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. *A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay.* J Immunol Methods, v. 170, n. 2, p. 211-24, Apr 1994.

ALTCLAS, J.; SINAGRA, A.; DICTAR, M.; LUNA, C.; VERÓN, M.T.; DE RISSIO, A. M.; GARCÍA, M. M.; SALGUEIRA, C.; RIARTE, A. *Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy.* Bone marrow transplantation, v.36, p.123-129, 2005.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. *The Trypanosoma cruzi-hostcellinter play: location, invasion, retention.* Nature Reviews Microbiology, v. 3, p.819-823, 2005.

ANDRADE, S. G. *Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.86(6), 624–626 1992.

ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES, A. L. *Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with trypanosoma-cruzi strains of different types.* Bulletin of the World Health Organization, v. 63, n. 4, p. 721-726, 1985.

ARAÚJO, M. S. *et al.* *A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease.* J Antimicrob Chemother, v. 45, n. 6, p. 819-24, Jun 2000.

BAHIA, M. T. *et al.* *Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease.* PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 11, p. e1870, 2012.

BAHIA, M. T. *et al.*(a) *Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease.* Antimicrob Agents Chemother, v. 58, n. 8, p. 4362-70, Aug 2014.

BAHIA, M. T.; DINIZ, L. E. F.; MOSQUEIRA, V. C.(b) *Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease*. Expert Opin Investig Drugs, v. 23, n. 9, p. 1225-37, Sep 2014.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *et al.* *Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection 14-30 years ago*. J Infect Dis, v. 182, n. 2, p. 634-8, Aug 2000.

BARBOSA-FERREIRA, J. M. *et al.* *Stroke in a chronic autochthonous chagasic patient from the Brazilian Amazon*. Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, n. 6, p. 751-3, 2010 Nov-Dec 2010.

BASTOS, C. J. *et al.* *Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil*. PLoS Negl Trop Dis, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.

BATISTA DA G, BATISTA MM, DE OLIVEIRA GM, BRITTO CC, RODRIGUES AC, *et al.*. *Combined treatment of heterocyclic analogues and benznidazole upon Trypanosoma cruzi in vivo*. PLoS One 6(7):e22155, 2012.

BENAIM, G. *et al.* *Amiodarone has intrinsic anti-Trypanosoma cruzi activity and acts synergistically with posaconazole*. J Med Chem, v. 49, n. 3, p. 892-9, Feb 2006.

BERENBAUM, M. C. *A method for testing for synergy with any number of agents*. J Infect Dis, v. 137, n. 2, p. 122-30, Feb 1978.

BLANCO, S. B. *et al.* *Congenital transmission of Trypanosoma cruzi: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina*. Trop Med Int Health, v. 5, n. 4, p. 293-301, Apr 2000.

BLAU, L. *et al.* *Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates*. Eur J Med Chem, v. 67, p. 142-51, Sep 2013.

BOCK, M.; GONERT, R.; HABERKORN, A.; *Studies with Bay 2502 on animals*. Bol Chil Parasitol 24: 13-19, 1969.

BRAGA, M. V.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. *Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 24, n. 1, p. 72-8, Jul 2004.

BRAGA, M.S.; LAURIA-PIRES, L.; ARGANÑARAZ, E.R.; NASCIMENTO, R.J.; TEIXEIRA, A.R.L. *Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives*. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo* 42: 157-161, 2000.

BRENER, Z. *Observations on immunity to superinfections in mice experimentally inoculated with Trypanosoma cruzi and subjected to treatment*]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 4, p. 119-23, 1962 Mar-Apr 1962.

BRENER, Z. *Biology of Trypanosoma cruzi*. *Annual review of microbiology*, v. 27, p. 347-383, 1973.

BRUN, R. *et al. Development of novel drugs for human African trypanosomiasis*. *Future Microbiol*, v. 6, n. 6, p. 677-91, Jun 2011.

BUCKNER, F. S. *Experimental chemotherapy and approaches to drug discovery for Trypanosoma cruzi infection*. *Adv Parasitol*, v. 75, p. 89-119, 2011.

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

BURGOS, J. M. *et al. Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of Trypanosoma cruzi to twins of a triplet delivery*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 65, n. 1, p. 58-61, Sep 2009.

BUSTAMANTE, J. M. *et al. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure Trypanosoma cruzi infection in mice*. *J Infect Dis*, v. 209, n. 1, p. 150-62, Jan 2014.

CALDAS, S. *et al. Trypanosoma cruzi: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole*. *Exp Parasitol*, v. 118, n. 3, p. 315-23, Mar 2008.

CANCADO, J. Romeu *et al.* Bases para a avaliação do tratamento específico da doença de Chagas humana segundo a parasitemia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 1973, vol.7, n.3, pp. 155-166.

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

CENCIG, S. *et al.* *Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with Trypanosoma cruzi strains.* *Int J Antimicrob Agents*, v. 40, n. 6, p. 527-32, Dec 2012.

CHAPADEIRO, E. *Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease.* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 309-310. 1999.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. *Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model.* *Drug Des Devel Ther*, v. 5, p. 175-81, 2011

CHIPPAUX, J. P. *et al.* *Antibody drop in newborns congenitally infected by Trypanosoma cruzi treated with benznidazole.* *Trop Med Int Health*, v. 15, n. 1, p. 87-93, Jan 2010.

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

CHOU, T. C. *Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method.* *Cancer Research*, v. 70, n. 2, p. 440-446, Jan 2010.

COURA, J. R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H. P. *Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro.* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 78, n. 3, p. 363-72, 1983 Jul-Sep 1983.

COURA, J. R. *et al.* *[Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil].* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 80, n. 1, p. 73-80, 1985 Jan-Mar 1985.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. *A critical review on Chagas disease chemotherapy*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002.

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

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

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. *Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR*. Mol Biochem Parasitol, v. 129, n. 1, p. 53-9, Jun 2003.

DASTGHEIB, L.; NASERI, M.; MIRASHE, Z. *Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial*. Int J Dermatol, v. 51, n. 12, p. 1508-11, Dec 2012.

DE ANDRADE, A. L. *et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection*. Lancet, v. 348, n. 9039, p. 1407-13, Nov 1996.

DE SOUZA, W. *Cell biology of *Trypanosoma cruzi**. Int Rev Cytol, v. 86, p. 197-283, 1984.

DIAS JCP.. *Epidemiology of Chagas disease (American trpanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT, São Paulo 49-80. 1992.

DIAS, JCP., and COURA, JR., org. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. *The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94 Suppl 1, p. 103-21, 1999.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C. e SCHOFIELD, C.J.. *The impact of Chagas disease control in Latin America: a review*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97, p. 603-612. 2002.

DIAS, J. C. P. *Notas sobre o Trypanosoma cruzi e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39, n. 4, p.370-375, 2006.

DIAS, J. P. *et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission*. Rev Soc Bras Med Trop, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008 May-Jun 2008.

DINIZ, L. E. F. *et al. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother, v. 54, n. 7, p. 2979-86, Jul 2010.

DINIZ, L. E. F. *et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments*. PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. *An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, v. 2, n. 1, p. 19-51, Jan 2007.

DUSCHAK, V. G. *A decade of targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2011 Sep1;6(3):216-59.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. *The clinical immunology of human Chagas disease*. Trends Parasitol, v. 21, n. 12, p. 581-7, Dec 2005.

DYBUL, M. *et al. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. Recommendations of the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV*. MMWR Recomm Rep, v. 51, n. RR-7, p. 1-55, May 2002.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. *Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection*. J. Exp. Med., v.188, p. 725-734, 1998.

ESCRIBÀ, J. M. *et al. Treatment and seroconversion in a cohort of children suffering from recent chronic Chagas infection in Yoro, Honduras*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 986-91, Nov 2009.

ESPUELAS, S. *et al.* Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. *Curr Med Chem*, v. 19, n. 25, p. 4259-88, 2012.

FAÚNDEZ, M. *et al.* Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, n. 5, p. 1837-9, May 2008.

FERNANDES, C. D. *et al.* Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 27-32, Feb 2009.

FERRAZ, M. L. *et al.* The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, n. 4, p. 1359-64, Apr 2007.

FERREIRA, H.O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 23:209–211, 1990.

FIELDS, R. D.; LANCASTER, M. V. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab*, v. 11, n. 4, p. 48-50, Mar 1993.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 81, n. 5, p. 755-9, 1987.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 11, p. 4097-102, Nov 2004.

FURLONG, S. T. Sterols of parasitic protozoa and helminths. *Exp Parasitol*, v. 68, n. 4, p. 482-5, May 1989.

GARCIA, E. S. *Trypanosoma cruzi* - vector-vertebrate hosts interactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 Suppl 1, p. 211-2, 1999.

GARCIA, S. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 4, p. 1521-8, Apr 2005.

GARZONI, L. R. *et al.* Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 23, n. 3, p. 273-85, Mar 2004.

GROSSO, N. L. *et al.* Combined treatment with benznidazole and allopurinol in mice infected with a virulent *Trypanosoma cruzi* isolate from Nicaragua. *Parasitology*, v. 140, n. 10, p. 1225-33, Sep 2013.

GUEDES, P. M. *et al.* Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 9, n. 5, p. 609-20, May 2011.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 1, p. 115-23, Jan 2012.

HALLANDER, H. O. *et al.* Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 22, n. 5, p. 743-52, Nov 1982.

HWANG, J. *et al.* Chloroquine or amodiaquine combined with sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated malaria: a systematic review. *Trop Med Int Health*, v. 11, n. 6, p. 789-99, Jun 2006.

JACKSON, Y. *et al.* Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis*, v. 51, n. 10, p. e69-75, Nov 2010.

JENNINGS, F. W.; URQUHART, G. M. The use of the 2 substituted 5-nitroimidazole, Fexinidazole (Hoe 239) in the treatment of chronic *T. brucei* infections in mice. *Z Parasitenkd*, v. 69, n. 5, p. 577-81, 1983.

JIA, J. *et al.* Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, v. 8, n. 2, p. 111-28, Feb 2009.

JONKER, M. J. *et al.* Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ Toxicol Chem*, v. 24, n. 10, p. 2701-13, Oct 2005.

KAISER, M. *et al.* Antitrypanosomal activity of fexinidazole, a new oral nitroimidazole drug candidate for treatment of sleeping sickness. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 12, p. 5602-8, Dec 2011.

KEENAN, M. *et al.* Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. *J Med Chem*, v. 55, n. 9, p. 4189-204, May 2012.

KEENAN, M. *et al.* Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. *J Med Chem*, v. 56, n. 24, p. 10158-70, Dec 2013.

KIRCHHOFF, L. V. Is *Trypanosoma cruzi* a new threat to our blood supply? *Ann Intern Med*, v. 111, n. 10, p. 773-5, Nov 1989.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*, v. 116, n. 3, p. 755-60, Mar 1976.

LAMAS, M. C. *et al.* Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int J Pharm*, v. 307, n. 2, p. 239-43, Jan 2006.

LAMBRECHT, F. L. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 7, n. 6, p. 346-52, 1965 Nov-Dec 1965.

LANA, M. *et al.* Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 8, p. 1139-47, Dec 2009.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D.L.; TEIXEIRA, A.R.L. Progressive chronic Chagas heart

disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63:111–118, 2000.

LEONARDI, D. *et al.* Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. Int J Pharm, v. 367, n. 1-2, p. 140-7, Feb 2009.

LEY, V. *et al.* Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. J Exp Med, v. 168, n. 2, p. 649-59, Aug 1988.

LIENHARDT, C. *et al.* New drugs for the treatment of tuberculosis: needs, challenges, promise, and prospects for the future. J Infect Dis, v. 205 Suppl 2, p. S241-9, May 2012.

LUNA, K. P. *et al.* In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. Biomedica, v. 29, n. 3, p. 448-55, Sep 2009.

MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v. 146, n. 4, p. 601-20, Apr 2007.

MAYER M, ROCHA LIMA H. Zur Entwicklung von *Schizotrypanum cruzi* in Saengatieren. Arch Schiffs u Tropen Hyg 16: 90-94, 1912.

MAYER M, ROCHA LIMA H. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmbluetern und Arthropoden. Arch Schiffsu Tropen-Hyg 5: 101-136, 1914.

MEDEIROS, M. B.; GUERRA, J. A.; LACERDA, M. V. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop, v. 41, n. 5, p. 520-1, 2008 Sep-Oct 2008.

MIKAMO, H. *et al.* Penetration of ravuconazole, a new triazole antifungal, into rat tissues. Chemotherapy, v. 48, n. 1, p. 7-9, Mar 2002.

MOLINA, J. *et al.* Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)

cruzi in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 1, p. 150-5, Jan 2000.

MOLINA, I., *et al.*, *Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease.* *N Engl J Med*. 2014 May 15;370(20):1899-908.

MONCAYO, A. *Progress towards interruption of transmission of Chagas disease.* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 Suppl 1, p. 401-4, 1999.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. *Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy.* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009.

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*. 2014 Apr 16;4:4703. doi: 10.1038/srep04703.

MOREIRA DA SILVA, R. et al. *Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method.* *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 6, p. 3344-8, Jun 2012.

NEAL, R. A.; VAN BUEREN, J. *Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro.* *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 82, n. 5, p. 709-14, 1988.

NOBREGA, A. A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J. E ARAUJO, W.N. *Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil.* *Emerg.Infect.Dis.*, v. 15, p. 653-655, 2009.

NUNES, M. C. *et al.* *Mortality prediction in Chagas heart disease.* *Expert Rev Cardiovasc Ther*, v. 10, n. 9, p. 1173-84, Sep 2012.

NYE, F. J. *Treating toxoplasmosis.* *J Antimicrob Chemother*, v. 5, n. 3, p. 244-6, May 1979.

ODDS, F. C. *Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them.* *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 1, p. 1, Jul 2003.

OLIVIERI, B. P. *et al.* A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*, v. 36, n. 1, p. 79-83, Jul 2010.

OLSEN, S. J. *et al.* Ravuconazole single ascending oral dose study in healthy subjects. Presented at: 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 17-20, 2000.

PEREIRA, J.B.; WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. *Morbidity in Chagas disease. III. Longitudinal study of 6 years, in Virgem da Lapa, MG, Brazil*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jan-Mar;80(1):63-71, 1985.

PEREZ-MAZLIAH, D. E. *et al.* Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. *J Antimicrob Chemother*, v. 68, n. 2, p. 424-37, Feb 2013.

PINAZO, M. J. *et al.* Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, n. 1, p. 390-5, Jan 2013.

PLANER, J. D. *et al.* Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 7, p. e2977, Jul 2014.

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

PRATA, A. *Classification of Chagas' infection in humans*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 23, n. 2, p. 109-13, 1990 Apr-Jun 1990.

RAETHER, W.; SEIDENATH, H. *The activity of fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica**. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 77, n. 1, p. 13-26, Feb 1983.

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

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. *Chagas disease*. Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr 2010.

RÄZ, B. *et al.* *The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (T.b. rhodesiense and T.b. gambiense) in vitro*. Acta Trop, v. 68, n. 2, p. 139-47, Nov 1997.

REMME, J.H.F.; FEENSTRA, P.; LEVER, P.R.; MEDICI, A.C.; MOREL, C.M.; NOMA, M.; RAMAIAH, K.D.; RICHARDS, F.; SEKETELI, A.; SHMINIS, VAN BRAKEL, W.H. E VASSAL, A. *Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis and leprosy*. Disease Control Priorities in Developing Countries, v. 22, p. 433-447.2006

REZENDE, J.M; MOREIRA, H. *Forma digestiva da doença de chagas. Em BRENNER Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO, M. Trypanosoma cruzi e doenças chagas, 2ª edição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. P, 297-342

RODRIGUES, J. H. *et al.* *A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against Trypanosoma cruzi*. PLoS One, v. 9, n. 1, p. e85706, 2014.

ROLDOS, V. *et al.* *Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi: in silico, in vitro and in vivo activity studies*. Eur J Med Chem, v. 43, n. 9, p. 1797-807, Sep 2008.

ROLÓN, M. *et al.* *Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of Trypanosoma cruzi epimastigotes*. Parasitol Res, v. 99, n. 2, p. 103-7, Jul 2006.

ROMAND, S.; PUDNEY, M.; DEROUIN, F. *In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother, v. 37, n. 11, p. 2371-8, Nov 1993.

ROMANHA, A. J. *et al.* *In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease.* Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105, n. 2, p. 233-8, Mar 2010.

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

RUSSOMANDO, G. *et al.* *Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction.* Am J Trop Med Hyg, v. 59, n. 3, p. 487-91, Sep 1998.

SANTA-RITA, R. M. *et al.* *Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis.* J Antimicrob Chemother, v. 55, n. 5, p. 780-4, May 2005.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* *Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction.* J Antimicrob Chemother, v. 52, n. 3, p. 441-9, Sep 2003.

SCHMUNIS, G. A. *Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America.* Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (Supl I): 93–101, 1999.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem.* Acta Trop, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254.

SCHMUNIS, G.A. *Epidemiology of Chagas disease in nonendemic countries : the role of international migration..* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 102 (Suppl. 1) : 75–85, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIOD A SAÚDE
Consenso Brasileiro em Doença de Chagas Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Vol. 38: SUPLEMENTO III, 2005.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, n. 1, p. 73-9, Jan 2006.

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

SHIKANAI-YASUDA, M.A., *et al.* *Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center* *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1990 Jan-Feb;32(1):16-27.

SILVA L.H.P. & NUSSENZWEIG V. *Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco*. *Folia Clin. Biol.* 20: 191-203. 1953.

SILVA, J. J. *et al.* *Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity*. *Br J Pharmacol*, v. 160, n. 2, p. 260-9, May 2010.

SILVEIRA, A. C.; FEITOSA, V. R.; BORGES, R. *Distribution of Triatominae captured in a domestic environment, 1975/83, Brazil*. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, v. 36, p. 15-312, 1984.

SILVEIRA, C. A.; CASTILLO, E.; CASTRO, C. *Evaluation of an specific treatment for Trypanosoma cruzi in children, in the evolution of the indeterminate phase*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 33, n. 2, p. 191-6, 2000 Mar-Apr 2000.

SOEIRO, M. N. *et al* (a). *Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review*. *Parasitology*, v. 140, n. 8, p. 929-51, Jul 2013.

SOEIRO, M.N.C.S.; DE DOUZA, E.M.; DASILVA, C.F.; BATISTA, D.G.J.; BATISTA, M.M.B.; PAVÃO, B.P. *et al.* (b). *In vitro and In vivo Studies of the Antiparasitic Activity of Sterol 14_-Demethylase (CYP51) Inhibitor VNI against Drug-Resistant Strains of Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother*.57(9):4151.2013.

SOSA ESTANI, S. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 59, n. 4, p. 526-9, Oct 1998.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 Suppl 1, p. 363-5, 1999.

SOUZA-LIMA, R. E. C. *et al.* Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 46, n. 4, p. 510-4, 2013 Jul-Aug 2013.

STREIGER, M. L. *et al.* Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 37, n. 5, p. 365-75, 2004 Sep-Oct 2004.

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*, v. 118, n. 4, p. 1301-10, Apr 2008.

SUASNÁBAR, F.; ARIAS, E.; STREIGER, M. Evolutive behaviour towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 42:99–109, 2000.

TALLARIDA, R. J. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, v. 98, n. 1-2, p. 163-8, Jul 2002.

TARRAL, A. *et al.* Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. *Clin Pharmacokinet*, v. 53, n. 6, p. 565-80, Jun 2014.

TEIXEIRA, A. R. *et al.* Chagas disease. *Postgrad Med J*, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec 2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; LOZZI S. P.; HECHT M. M.; ROSA A. C.; MONTEIRO, P. S. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Cadernos Saúde Pública*, v. 25, suppl.1, p. S32-S44, 2009.

- TOLEDO, M. J. *et al.* Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 1, p. 223-30, Jan 2003.
- TORREELE, E. *et al.* Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, n. 12, p. e923, 2010.
- TORRICO, F.; ALONSO-VEJA, C.; SUAREZ, E. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*; 70: 201–09, 2004.
- TWEATS, D.; BOURDIN TRUNZ, B.; TORREELE, E. Genotoxicity profile of fexinidazole--a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). *Mutagenesis*, v. 27, n. 5, p. 523-32, Sep 2012.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, v. 31, n. 5-6, p. 472-81, May 2001.
- URBINA, J. A. *et al.* Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, n. 7, p. 1771-7, Jul 1998.
- URBINA, J. A. *et al.* Antiproliferative synergism of the allylamine sf-86327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma-(Schizotrypanum)-cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, n. 8, p. 1237-1242, Aug 1988.
- URBINA, J. A. *et al.* In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 9, p. 2498-502, Sep 2000.
- URBINA, J. A. *et al.* Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 3, p. 580-91, Mar 1993.

URBINA, J. A., *et al.*, *Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies*. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Jul;42(7):1771-7.

URBINA, J. A. *et al.* *Squalene synthase as a chemotherapeutic target in Trypanosoma cruzi and Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol, v. 125, n. 1-2, p. 35-45, 2002 Nov-Dec 2002.

URBINA, J. A. *et al.*(b) *In vitro and in vivo activities of ravuconazole on Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease*. Int J Antimicrob Agents, v. 21, n. 1, p. 27-38, Jan 2003.

URBINA, J. A. *Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104 Suppl 1, p. 311-8, Jul 2009.

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

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R.(a) *Specific chemotherapy of Chagas Disease: controversies and advances*. TENDS in Parasitology. Vol 9 n° 11, November, 2003.

VALDEZ, R. H. *et al.* *In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole*. Antimicrob Agents Chemother, v. 56, n. 1, p. 507-12, Jan 2012.

VEIGA-SANTOS, P. *et al.* *Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of Trypanosoma cruzi*. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 40, n. 1, p. 61-71, Jul 2012.

VILLALTA, F. *et al.* *VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease*. J Infect Dis, v. 208, n. 3, p. 504-11, Aug 2013.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. *Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up*. Am. Heart J. 127:151–162, 1994.

- VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. *Enzyme immunoassays in diagnostic medicine*. Theory and practice. Bull World Health Organ, v. 53, n. 1, p. 55-65, 1976.
- WATT, K. *et al.* *Triazole use in the nursery: fluconazole, voriconazole, posaconazole, and ravuconazole*. Curr Drug Metab, v. 14, n. 2, p. 193-202, Feb 2013.
- WHO. World Health Organization. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Fact sheet N°340. Updated March, 2013.
- WILKINSON, S. R. *et al.* *A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, n. 13, p. 5022-7, Apr 2008.
- WILKINSON, S. R. *et al.* *Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives*. Curr Top Med Chem, v. 11, n. 16, p. 2072-84, 2011.
- WYLLIE, S.; PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A. H. *Assessing the essentiality of Leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation*. Antimicrob Agents Chemother, v. 57, n. 2, p. 901-6, Feb 2013.
- YUN, O. *et al.* *Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières*. PLoS Negl Trop Dis, v. 3, n. 7, p. e488, 2009.
- ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J. E. *Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors*. Annu Rev Entomol, v. 26, p. 101-33, 1981.
- ZINGALES, B. *et al.* *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009.
- ZORDOKY, B. N.; EL-KADI, A. O. *H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart*. J Pharmacol Toxicol Methods, v. 56, n. 3, p. 317-22, 2007 Nov-Dec 2007.