

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC

Tese

**INFLUÊNCIA DA DOENÇA DE
CHAGAS NA
FARMACOCINÉTICA DO
BENZNIDAZOL NO MODELO
CÃO**

Lorena Cera Bandeira

Ouro Preto
2022



UFOP

Lorena Cera Bandeira

**INFLUÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NA FARMACOCINÉTICA DO
BENZNIDAZOL NO MODELO CÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro

Coorientador: Dr. Leonardo Santos Ribeiro Pinto

Ouro Preto – MG
2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B214i Bandeira, Lorena Cera.
Influência da doença de Chagas na farmacocinética do Benznidazol
no modelo cão. [manuscrito] / Lorena Cera Bandeira. - 2022.
101 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.

Coorientador: Dr. Leonardo Pinto.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de
Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e
Animal.

1. Doença de Chagas. 2. Farmacocinética. 3. Cães. I. Carneiro,
Cláudia Martins. II. Pinto, Leonardo. III. Universidade Federal de Ouro
Preto. IV. Título.

CDU 606:628

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorena Cera Bandeira

"Influência da doença de Chagas na farmacocinética do benznidazol no modelo cão"

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Aprovada em 05 de dezembro de 2022

Membros da banca

Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro (Presidente - UFOP)
Prof. Dr. Leonardo Santos Ribeiro Pinto (Co-Orientador - UFOP).
Profa. Dra. Andrea Diniz (Membro - UEM)
Profa. Dra. Fernanda de Lima Moreira (Membro - UFRJ)
Profa. Dra. Vanja Maria Veloso (Membro - UFOP)
Prof. Dr. Wander de Jesus Jeremias (Membro - UFOP)

Cláudia Martins Carneiro, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 06/12/2022



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Martins Carneiro, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/12/2022, às 22:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0439332** e o código CRC **8DAB7C45**.

DEDICATÓRIA

Para marido, com amor!
A você, José Ricardo, dedico este trabalho.
Sua presença tranquila, seu apoio incondicional
e seus conselhos, sempre sensatos, foram fundamentais para
juntos encerrarmos este ciclo.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Cláudia Martins Carneiro que, desde a iniciação científica, esteve comigo de mãos dadas. Obrigada pelo acompanhamento e por todo conhecimento compartilhado. Você me inspira por sua versatilidade, seu dinamismo, sua praticidade além de sua competência e brilhantismo. Agradeço-a também por todo apoio emocional em situações diversas da minha vida pessoal.

Ao Prof Dr Leonardo Pinto por me fazer apaixonar pelo universo da Farmacocinética. De maneira bem discreta, você chegou em minha vida e desejo que assim permaneça, pois ainda temos um lindo caminho pela frente. Você se dedica a me ensinar tudo que acha fundamental para que eu me torne uma profissional melhor e mais capacitada. Agradeço por sempre me guiar e orientar desde o início quando tudo ainda era confuso.

À Profª Drª Paula Melo de Abreu Vieira por contribuir, juntamente com sua equipe do Laboratório de Morfopatologia, na execução dos experimentos e também pelas sugestões e análises que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr Glauco Nardotto e à Drª Kátia Fonseca pela colaboração nas análises desse trabalho.

Ao médico veterinário Hugo Costa pelo suporte e acompanhamento em todas as etapas da experimentação e a todos os colaboradores do Centro de Ciência Animal da UFOP. Foram longos períodos de convívio no canil, mas a presteza e disposição em ajudar sempre estiveram presentes.

Aos colegas de caminhada na pós-graduação: Luciana, Eloan, Thais Ostolin, Gabriel, Rory Brito, Ana Flávia, Gabriel, Jamille Mirelle, Thays Fernanda. Nossa convivência sempre animada renovava as forças e a parceria, dentro e fora do laboratório, deixaram a jornada mais agradável. Gratidão por tudo!

Aos alunos de iniciação científica, carinhosamente denominados LIMPinhos: Suzana, Pauliana, Beatriz, Amanda, Aline, Bruno e Marcus. Muito obrigada por tudo! O trabalho de vocês garantiu que os experimentos acontecessem de forma organizada e precisa. Que vocês levem todo o aprendizado adquirido para a vida profissional de vocês!

Ao corpo técnico do Laboratório de Imunopatologia, Luciana (atualmente nossa mestranda), Rosália, João Vitor e Lúcia pela agradável convivência e pela grande importância na manutenção das atividades diárias fundamentais para atender a todos os colaboradores do Laboratório.

Aos integrantes do Laboratório de Imunopatologia e Morfopatologia por manterem sempre vivo o espírito de trabalho em equipe.

À Josiane e a todos os colaboradores da farmácia de manipulação Acurácia Farmacêutica pela presteza e cuidado em preparar as formulações utilizadas no estudo. Carinho e gratidão por toda nossa história juntos!

À minha mãe Eliete e aos meus amados irmãos Lorenzo e Lunara por serem meu alicerce. Agradeço a torcida, as orações e o apoio em cada etapa. Vocês sempre acreditaram em mim e sou muito grata por isso! Amo vocês!

A todos os meus familiares, em especial meu sogro José Nonato e minha sogra Ângela, por sempre se fazerem presentes.

À Juliana e Laís, minhas grandes amigas, pelos momentos de descontração após longas jornadas de trabalho. Vocês são demais “Margas”!

Ao meu treinador Caio Aguiar e a todos os colegas do grupo de corrida SAA da Vila Samarco. Vocês foram essenciais para garantir não só saúde física, mas também mental durante toda a caminhada.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao CNPq, FAPEMIG e UFOP pelo financiamento do projeto.

RESUMO**INFLUÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NA FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL NO MODELO CÃO**

A alta variabilidade na eficácia e na segurança da quimioterapia anti-chagásica envolvendo o benznidazol (BNZ) pode ser devido às alterações farmacocinéticas. Tais alterações podem ser ocasionadas pela inibição de enzimas de metabolismo e transportadores de membranas devido ao aumento de mediadores do processo inflamatório na doença de Chagas. O presente estudo avaliou o impacto das infecções experimentais aguda e crônica pela cepa Be-78 do *T. cruzi* na farmacocinética do BNZ no modelo cão. Foram investigados 19 cães (n= 10 cães com infecção aguda; n= 9 cães com infecção crônica), SRD, com idade entre 04-10 meses e peso entre 20-35 kg. Os cães de ambas as fases da infecção foram divididos em dois grupos, sendo o Grupo I (infectado não tratado) e Grupo II (infectado e tratado). O estudo foi dividido em 4 ocasiões. Na Ocasão 1 (antes da infecção) foi realizada coleta de sangue para análise de perfil das citocinas IL-6, IFN- γ , IL-10 e TNF- α por meio de ensaio de ELISA. Na Ocasão 2 (após a infecção, antes do início do tratamento) foi coletado sangue para análise de citocinas e carga parasitária por meio de qPCR. Na Ocasão 3 (após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral 3,5mg/Kg/12h de BNZ) foi realizada coleta seriada de sangue no intervalo de dose de 12h para análise farmacocinética para o Grupo II; e coleta de sangue para análise de citocinas e carga parasitária para os Grupos I e II. Na Ocasão 4 (após 30 dias do término do tratamento) foi coletado sangue para análise de citocinas e carga parasitária. O BNZ nas amostras de soro foi quantificado por CLAE-DAD. O método bioanalítico validado seguindo o guia da ANVISA, apresentou ausência de efeitos matriz e residual; limites de quantificação, estabilidade, precisão e exatidão compatíveis para a análise do BNZ em soro. Os parâmetros farmacocinéticos do BNZ, obtidos a partir de um modelo não compartimental, foram similares entre os momentos de coleta seriada na Ocasão 3 na fase aguda e também na fase crônica da infecção. O perfil farmacocinético do BNZ obtido em cães na fase aguda da doença é semelhante ao observado em cães saudáveis (dados históricos do nosso grupo de pesquisa). Por outro lado, foi observado que a infecção crônica aumenta os valores de C_{max} (9,70 vs 17,97), C_{ss} (7,70 vs 12,56) e AUC_{0-12} (90,39 vs 150,76), e ainda reduz V_{dss} (17,34 vs 9,20) e CL_{ss} (0,84 vs 0,56) quando comparados com o grupo de cães saudáveis. Em relação a fase aguda, a fase crônica também eleva os valores de C_{max} (10,55 vs 17,97), C_{ss} (7,08 vs 12,56), C_{min} (4,32 vs 8,25) e AUC_{0-12}

(84,98 vs 150,76) e reduz Vdss (13,92 vs 9,20) e CLss (0,99 vs 0,56). Os mediadores inflamatórios IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6 estão aumentados nas fases aguda e crônica da doença, sendo a IL-6 a citocina produzida em maior quantidade e a única com aumento significativo (em até 7 vezes) de suas concentrações séricas nos cães da fase crônica em relação à fase aguda, mesmo quando o tratamento com o BNZ é administrado. Nos grupos I e II da fase aguda é observada uma elevada carga parasitária na Ocasão 2 que é reduzida significativamente nas Ocasões 3 e 4. Nos grupos I e II da fase crônica observa-se uma baixa carga parasitária nas Ocasões 2 e 3, e um aumento significativo da carga parasitária na Ocasão 4. Portanto, a infecção crônica experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* altera significativamente a farmacocinética do BNZ em cães, provavelmente pela inibição do transporte de membrana glicoproteína-P (P-gp) causada pelo aumento da citocina pró-inflamatória IL-6.

Palavras-chave: doença de Chagas, benznidazol, farmacocinética, citocina, transportadores de membrana, cão.

ABSTRACT

INFLUENCE OF CHAGAS DISEASE ON THE PHARMACOKINETICS OF BENZNIDAZOLE IN THE DOG MODEL

The high variability in efficacy and safety of anti-chagasic chemotherapy involving benznidazole (BNZ) may be due to pharmacokinetic changes. Such alterations can be caused by the inhibition of metabolism enzymes and membrane transporters due to the increase in mediators of the inflammatory process of Chagas disease. The present study evaluated the impact of experimental acute and chronic infections by the Be-78 strain of *T. cruzi* on the pharmacokinetics of BNZ in the dog model. Nineteen dogs (n=10 dogs with acute infection; n=9 dogs with chronic infection), SRD, aged between 04-10 months and weight between 20-35 kg were investigated. Dogs in both stages of infection were divided into two groups, Group I (infected and untreated) and Group II (infected and treated). The study was divided into 4 occasions. On Occasion 1 (before infection), blood was collected for analysis of the profile of cytokines IL-6, IFN- γ , IL-10 and TNF- α by means of an ELISA assay. On Occasion 2 (after infection, before starting treatment) blood was collected for analysis of cytokines and parasite load by qPCR. On Occasion 3 (after 10, 30, 40 and 60 days of oral multiple dose 3.5mg/Kg/12h of BNZ) serial blood collection was performed in the 12h dose interval for pharmacokinetic analysis for Group II; and blood collection for analysis of cytokines and parasite load for Groups I and II. On Occasion 4 (30 days after the end of treatment) blood was collected for analysis of cytokines and parasite load. BNZ in serum samples was quantified by HPLC-DAD. The validated bioanalytical method following the ANVISA guide, showed no matrix and residual effects; limits of quantification, stability, precision and accuracy compatible for the analysis of BNZ in serum. BNZ pharmacokinetic parameters, obtained from a non-compartmental model, were similar between the serial collection times on Occasion 3 in the acute phase and also in the chronic phase of the infection. The pharmacokinetic profile of BNZ obtained in dogs in the acute phase of the disease is similar to that observed in healthy dogs (historical data from our research group). On the other hand, chronic infection was observed to increase C_{max} (9.70 vs 17.97), C_{ss} (7.70 vs 12.56) and AUC₀₋₁₂ (90.39 vs 150.76) values, and still reduces V_{dss} (17.34 vs 9.20) and CL_{ss} (0.84 vs 0.56) when compared to the group of healthy dogs. Regarding the acute phase, the chronic phase also increases the values of C_{max} (10.55 vs 17.97), C_{ss} (7.08 vs 12.56), C_{min} (4.32 vs 8.25) and AUC₀₋₁₂ (84.98 vs 150.76) and reduces V_{dss} (13.92 vs 9.20) and CL_{ss} (0.99 vs 0.56). The inflammatory mediators IFN- γ , IL-10, TNF- α and IL-6 are increased in the acute and chronic phases of the disease, with IL-6 being the cytokine produced in greater quantity and the only one with a significant increase (up to 7 times) of their serum concentrations in dogs in the chronic phase compared to the acute phase, even when treatment with BNZ is administered. In groups I and II of the acute phase, a high parasite load is observed on Occasion 2, which is significantly reduced on Occasions 3 and 4. In groups I and II of the chronic phase, a low parasite load is observed on Occasions 2 and 3, and a significant increase in parasite load on Occasion 4. Therefore, experimental chronic infection with the Berenice-78 strain of *T. cruzi* significantly alters the pharmacokinetics of BNZ in dogs, probably by inhibiting P-glycoprotein (P-gp) membrane transport caused by increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6.

Keywords: Chagas disease, benznidazole, pharmacokinetics, cytokine, membrane transporters, dog.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura molecular do benznidazol.....23
- Figura 2 - Gráfico do tamanho da amostra em função do poder do teste..... 31
- Figura 3 - Delineamento experimental. Ocasão 1 (Antes da Infecção): coleta seriada de sangue nos tempos 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10 e 12 h para análise Fenotípica e perfil de citocinas. Ocasão 2 (Após infecção, antes de iniciar o tratamento): coleta seriada de sangue conforme a Ocasão 1 e carga parasitária. Ocasão 3 (Após 10, 30, 40 e 60 dias da administração do benznidazol): coleta seriada de sangue conforme a Ocasão 2 e para análise farmacocinética do benznidazol. Ocasão 4 (Após 30 dias do término do tratamento com benznidazol): coleta seriada de sangue conforme a Ocasão 2. Wash out: período de 3 a 5 dias entre ocasiões. 33
- Figura 4 - Protocolo experimental da tese. Ocasão 1 - Antes da Infecção: Análise do perfil de citocinas IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α . Ocasão 2 - Após infecção, antes de iniciar o tratamento: Análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e de carga parasitária. Ocasão 3 - Após 10, 30, 40 e 60 dias da administração do benznidazol: Análise dos parâmetros farmacocinéticos, análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e de carga parasitária. Ocasão 4 - Após 30 dias o término do tratamento com benznidazol: Análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e de carga parasitária. 34
- Figura 5 - Peso médio dos cães infectados pela cepa Be-78 do T. cruzi na fase aguda e na fase crônica da doença de Chagas, tratados ou não com dose múltipla de 3,5mg de BNZ/Kg/12h/60 dias. As linhas representam as médias e as barras o IC 95%. 50
- Figura 6 - Cromatogramas referentes às análises do BNZ em soro canino. (A) Soro branco; (B) Soro branco enriquecido com 5 μ g de BNZ/mL; (C) Soro de cão após 6 h de administração de dose múltipla de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ. Picos: 1- BNZ; 2- omeprazol (PI). 51
- Figura 7 : Curvas de concentrações séricas versus tempo do BNZ administrado após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h em cães SRD, na fase aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do T. cruzi. As linhas representam as medianas dos valores observados e as áreas hachuradas representam os valores de IQ 25-75 % 55

Figura 8 - Box plot da influência da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, em cães SRD, nos parâmetros farmacocinéticos do BNZ administrado após 10, 30, 40 e 60 dias em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h nas fases aguda (n=6) e crônica. 58

Figura 9 - Curvas de concentrações séricas versus tempo do BNZ administrado em doses múltiplas de 3,5 mg/Kg/12h via oral em cães SRD, sadios (n=8) e na fase aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. As linhas representam as medianas dos valores observados e as áreas hachuradas representam os valores de IQ 25-75 %. 59

Figura 10 - Box plot da influência da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, em cães SRD, nos parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h, por 60 dias, nas fases aguda (n=6) e crônica (n=5). 61

Figura 11 - Perfil das citocinas IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6 em soro de cães antes (Basal) e após infecção aguda (FA) e crônica (FC) pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. GI: Grupo I (infectado e não tratado); GII: Grupo II (infectado e tratado). *GI FC vs Basal, $p < 0,05$. ^aGI ou GII FC vs Basal, $p < 0,05$. ^bGI ou GII FC vs GI FA, $p < 0,05$. ^cGI ou GII FC vs GII FA, $p < 0,05$ 64

Figura 12 - Avaliação da carga parasitária no sangue dos cães SRD infectados experimentalmente pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, pertencentes aos grupos: controle infectado e não tratado (G I) e infectado e tratado com Benznidazol (G II). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelos traços. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de validação do método de análise do benznidazol em soro.....	53
Tabela 2 Estudo de estabilidade do benznidazol em soro.	54
Tabela 3 -Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h (10, 30, 40 e 60 dt) em cães SRD, na fase aguda (n=6) da infecção experimental pela cepa Be-78 do T. cruzi. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).	56
Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h (10, 30, 40 e 60 dt) em cães SRD, na fase crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do T. cruzi. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).	57
Tabela 5 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h, por 60 dias, em cães SRD, nas fases aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do T. cruzi. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).	60

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 - CHAGAS: A DOENÇA SILENCIOSA E SILENCIADA	16
2.2 - IMUNIDADE E INFLAMAÇÃO NAS DIFERENTES FASES DA DOENÇA	19
2.3 - TRATAMENTO ETIOLÓGICO NA FASE CRÔNICA: UM PROBLEMA AINDA SEM SOLUÇÃO	22
2.3.1 - Química e Farmacocinética do benznidazol	22
2.3.2 - Mecanismo de ação	24
2.3.3 - Efeitos adversos	25
2.3.4 - Falha terapêutica na fase crônica da DCh	25
2.4 - O PODER TRANSLACIONAL DO MODELO CÃO NA DCh	26
3 - JUSTIFICATIVA	29
4 - OBJETIVOS	30
4.1 - OBJETIVO GERAL	30
4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 - ASPECTOS ÉTICOS	31
5.2 - CÁLCULO AMOSTRAL	31
5.3 - ANIMAIS	32
5.4 - INÓCULO E INFECÇÃO	32
5.5 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL	32
5.6 - AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA POR EXAME A FRESCO	36
5.7 - COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	37
5.8 - ANÁLISE HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA NO SORO CANINO	37
5.9 - ANÁLISE DO BENZNIDAZOL EM SORO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)	38
5.10 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO BENZNIDAZOL EM SORO	39
5.11 - ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL	44
5.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.13 - PESQUISA DE CITOCINAS SÉRICAS PELA ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	45
5.14 - QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR QPCR	46
6 - RESULTADOS	49
6.1 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL	49
6.2 - MÉTODO	50
6.3 - PERFIL DE CITOCINAS	63
6.4 - CARGA PARASITÁRIA	65
7 - DISCUSSÃO	67
8 - CONCLUSÕES	79
9 - REFERÊNCIAS	80

1 - Introdução

O progresso da ciência, o desenvolvimento e o uso de novas tecnologias e, porque não, a Biotecnologia podem ser considerados os pilares da sociedade moderna. Avanços jamais vislumbrados anteriormente alcançaram grande amplitude com a descoberta de novos protocolos de tratamentos, de medicamentos e de vacinas. No contexto das doenças negligenciadas, a Biotecnologia representa uma das ferramentas para preencher a lacuna existente no que diz respeito à pesquisa e ao desenvolvimento de novos produtos e também no entendimento das falhas terapêuticas de medicamentos já utilizados.

A presente tese se propôs a refletir sobre o seguinte problema: de que forma a Biotecnologia aplicada à saúde, por meio da produção científica voltada para a farmacocinética pré-clínica, pode contribuir para uma farmacoterapia mais eficaz da doença de Chagas (DCh)?

A DCh, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma antroponose tropical causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* caracterizada por uma patogênese extremamente complexa. O Benznidazol (BNZ) é um nitroimidazol administrado por via oral, único fármaco disponível para o tratamento da DCh no Brasil, apresenta eficácia variável nas diferentes fases da doença, necessita de alta frequência de administração, além de causar consideráveis efeitos adversos. Tais inconvenientes podem estar relacionados com suas propriedades farmacocinéticas que, para o paciente, se traduzem em baixa adesão e, conseqüentemente, baixa efetividade do tratamento. Neste sentido, os estudos de farmacocinética são importantes, uma vez que avaliam aspectos relacionados à biodisponibilidade, ao volume de distribuição e à excreção de fármacos e ao metabolismo para identificar possíveis causas da ineficácia terapêutica ou ainda justificar o surgimento de efeitos tóxicos. Para o BNZ, os estudos de farmacocinética foram historicamente negligenciados, sendo escassas as informações.

Nessa perspectiva, o presente trabalho foi estruturado em três momentos que dialogam em sua estrutura experimental. Inicialmente é apresentada a validação de um método bioanalítico para quantificação do fármaco BNZ em soro de cães. A seguir, tem-se os ensaios farmacocinéticos em amostras de animais experimentalmente infectados pela cepa Berenice-78 (Be-78) do *T. cruzi* e tratados com dose múltipla oral de 3,5mg/Kg/12h de BNZ por 60 dias nas fases aguda e crônica da DCh. Por fim, foi avaliado

o perfil de citocinas durante as diferentes fases da infecção para investigar o papel da doença na farmacocinética do BNZ.

O trabalho é um reconhecimento da importância de estudos pré-clínicos que, ao identificar as causas das falhas existentes na farmacoterapia utilizada atualmente para a DCh, possibilita o entendimento e auxilia na obtenção de respostas para solucionar um antigo problema: como tratar de maneira efetiva um paciente portador da DCh?

2 - Referencial Teórico

2.1 - Chagas: a doença silenciosa e silenciada

As infecções por protozoários são comuns em países subdesenvolvidos tropicais, onde as condições sanitárias, de moradia e o controle de vetores são considerados inadequados. Por serem eucariotos, os protozoários têm processos metabólicos similares aos hospedeiros humanos fato que dificulta o seu tratamento pois os fármacos utilizados na quimioterapia causam efeitos tóxicos, particularmente em células com atividade metabólica elevada, como células neuronais, tubulares renais e intestinais (HOWLAND & MYCEK, 2007)

Causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, a DCh também denominada “doença silenciosa e silenciada” (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO, 2021), pode ser transmitida por mecanismos vetoriais e não vetoriais que incluem consumo de alimentos ou bebidas contaminadas, transfusão de sangue ou hemoderivados de doadores infectados, transmissão materno fetal, transplantes e acidentes de laboratório (SANTOS *et al.*, 2020; MANSOLDO *et al.*, 2020; COURA, 2015).

Embora 6–7 milhões de indivíduos infectados vivam nas Américas, a DCh se tornou emergente em áreas não endêmicas como América do Norte, Europa (Áustria, Bélgica, França, Alemanha, Itália, Holanda, Portugal, Espanha, Suécia, Suíça e Reino Unido), Japão e Austrália, devido à migração de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, contribuindo para a globalização da doença (WHO, 2022; LOSADA *et al.*, 2020; STEVERDING, 2014). Estima-se que o número de mortos anualmente chega a 12 000 e que 75 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença. (DNDi, 2022).

No Brasil, devido à triagem de hemotransfusão e ao controle de vetores, a DCh teve sua prevalência reduzida nos últimos anos, sendo 1284 o número de novos casos notificados no período de 2017- 2020 dos quais 1206 estão localizados na Região Norte com destaque para o estado do Pará (994), seguido pela Região Nordeste (64 casos) e, a seguir, pelas Regiões Sudeste e Centro-Oeste (ambas com 7 casos) (DATASUS, 2022).

Uma vez ocorrida a infecção, a doença segue um curso que reflete os aspectos relacionados com o ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado, ou seja, formas tripomastigotas em elevado número no sangue circulante nos momentos iniciais que, mais adiante, irão compor os ninhos de amastigotas que serão observados na musculatura lisa ou estriada cardíaca do hospedeiro. Tem-se, portanto, dois momentos distintos da DCh: a fase aguda e a fase crônica que diferem em aspectos imunopatológicos, resposta inflamatória e ainda quanto à eficácia terapêutica.

A fase aguda inicia-se logo após a infecção e seu tempo de duração pode variar de semanas a meses sendo geralmente assintomática ou associada a sintomas inespecíficos que podem incluir febre, náuseas e dores de cabeça. Essa fase é marcada por elevada parasitemia com ativação das células da resposta imune inata na tentativa de conter infecção inicial pelo *T. cruzi*. Há então uma interação dos compostos do parasito com os receptores toll-like (TLRs) a fim de estimular a capacidade desta resposta imune no combate ao parasito (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Após esta interação inicial, as células da resposta imune inata emitem diferentes sinais intracelulares que culminam com a ativação do fator nuclear-kB (NF-kB). Assim, macrófagos, células dendríticas e células *natural killers* (NKs) desencadeiam uma forte resposta inflamatória ao longo desta fase com aumento pronunciado da produção de citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10) conectando a resposta inata à resposta adaptativa (MACHADO *et al.*, 2012; ANDRADE, GOLLOB E DUTRA, 2014; QIDWAI & KHAN, 2016).

É importante destacar que, apesar dos esforços do sistema imune na contenção da infecção, algumas moléculas expressas pelo parasito podem favorecer sua permanência no hospedeiro. Os mecanismos incluem a expressão de enzimas como a trans-sialidase e cruzaina e a produção de mucinas que auxiliam na evasão do *T. cruzi* (Da FONSECA *et al.*, 2019; DIAZ *et al.*, 2015; DOYLE *et al.*, 2011; ALCAIDE & FRESNO, 2004). Revisões recentes discutiram como o parasita escapa das vias clássicas, da lectina e do

complemento alternativo para estabelecer a infecção (ACEVEDO *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2014 ; LIDANI *et al.*, 2017).

Outro fator que merece destaque na ação inicial da resposta imune é a cepa do parasito. Isso porque o *T. cruzi* apresenta grande variabilidade genética, tanto em relação ao seu DNA nuclear (nDNA), quanto ao DNA do cinetoplasto (kDNA). Assim, de acordo com suas diferenças genéticas e geográficas as cepas do parasito foram classificadas em *discrete typing units* (DTUs) de seis tipos: TcI - TcVI. Atualmente, foi proposto um sétimo tipo, a TcBat.(ZINGALES *et al.*, 2012). Um estudo com duas cepas de DTUs diferentes (TcI e TcII) na infecção aguda mostrou que a cepa Col cl1.7, pertencente ao TcI, levou a uma maior ativação de monócitos e produção de IL-10, enquanto a cepa Y, pertencente à TcII, ativa menos monócitos, porém, causa uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares periféricas (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

Na maioria dos casos, a imunidade adaptativa que se desenvolve é suficiente para manter a parasitemia em níveis muito baixos e para gerar uma resposta inflamatória intensa que causa danos em tecidos como fígado e baço (MILLS, 2020).

Em casos raros (cerca de 5 a 10% dos pacientes) a infecção aguda leva à morte súbita (PRATA, 2001; URBINA, 2015) e aqueles que sobrevivem progridem para uma fase inflamatória crônica na qual é possível distinguir dois subtipos que consideram o tempo decorrente da infecção. A “fase crônica recente” na qual a infecção ocorreu há 10 anos ou se os pacientes forem crianças menores de 12 anos. Já os pacientes que apresentam mais de 10 anos de infecção apresentam-se na “fase crônica tardia”(COURA e CASTRO, 2002).

A parasitemia é baixa ou indetectável e o diagnóstico é baseado em métodos sorológicos convencionais e em métodos moleculares, que exibem perfis mais aceitáveis de sensibilidade e especificidade quando comparados aos métodos parasitológicos convencionais (NOGUERIA *et al.*, 2018; DE LANA E MARTINS-FILHO, 2015). A ausência de sinais e sintomas, baixos níveis de parasitos no sangue e outros tecidos observados nessa fase caracteriza a forma indeterminada da doença. Já nos casos sintomáticos 20 a 40% dos pacientes desenvolvem a forma digestiva (megacólon e megaesôfago) e/ou a forma cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica - CCC) em um

período de tempo variando de anos a décadas após a infecção (MARIN-NETO *et al.*, 2013).

As principais manifestações das megasíndromes incluem dilatação do esôfago e cólon com espessamento de suas paredes, distúrbios segmentares do peristaltismo do trato digestivo, disfagia, regurgitação e constipação. Tais alterações são causadas pelo parasitismo e inflamação nos órgãos digestivos, determinando perda severa de células musculares lisas e destruição de neurônios parassimpáticos intramurais (MATSUDA, MILLER, EVORA, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Já na CCC, as alterações observadas incluem o aumento do coração em resposta à remodelação microestrutural associada ao parasitismo do cardiomiócito, denervação autonômica, inflamação persistente de baixo grau, desequilíbrio redox e estresse oxidativo, eventos tromboembólicos, arteriolite necrosante, cardiomiocitolise, mionecrose e fibrose miocárdica progressiva (BONNEY *et al.*, 2019; RASSI *et al.*, 2017). É a mais severa e incapacitante manifestação e a principal causa de morbidade e mortalidade na DCh visto que são observadas alterações clínicas que incluem arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral podendo inclusive levar à morte súbita.

A persistência do parasito no tecido cardíaco é apontada como fator-chave para a progressão da doença, seja pela imunidade anti *T. cruzi*, autoimunidade ou outros mecanismos, sugerindo que a redução da carga parasitária é fundamental para combater a doença (HYLAND *et al.*, 2007; VIOTTI *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2010; BOCCHI *et al.*, 2017; BONNEY *et al.*, 2019). Tanto na patogênese das megasíndromes quanto na CCC são observados processos complexos e multifatoriais como a desnervação autonômica, insuficiência microvascular e dano oxidativo (ECHEVERRIA e MORILLO, 2019; BONNEY, LUTHRINGER e KIM, 2019)

2.2 - Imunidade e inflamação nas diferentes fases da doença

As manifestações clínicas observadas no hospedeiro vertebrado e infectado pelo *T. cruzi*, estão relacionadas com a resposta imune que é direcionada ao parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Assim, a atuação da resposta humoral e celular específica, possui uma ação ambígua pois, apesar de contribuírem para uma redução da carga parasitária, permite o surgimento das lesões características da DCh.

Considerando as duas fases distintas da doença é importante entender que, por meio de uma resposta imune, diferenciada para cada fase, ocorre liberação de citocinas em resposta a infecção pelo *T. cruzi*.

Citocinas e quimiocinas secretadas por células inatas e as células imunes adaptativas são responsáveis pelo recrutamento celular e comunicação, facilitando a eliminação de patógenos por vários mecanismos (MARSHALL *et al.*, 2018). Na DCh, após ativação via TLR, macrófagos e células dendríticas começam a produzir moléculas pró-inflamatórias que serão envolvidas em respostas inflamatórias sistêmicas contra o parasito, exigindo a ação de vários mediadores, como as citocinas interleucinas (IL)-1b, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, o fator de necrose tumoral (TNF) e IFN- γ , quimiocinas e o óxido nítrico (RODRIGUES *et al.*, 2012; ANTÚNEZ e CARDONI, 2000; FONSECA *et al.*, 2019)

As diferentes citocinas como, por exemplo, IFN- γ , IL6, TNF α e IL-10, além de cumprirem um papel importante na patogênese e na progressão da doença estarão implicadas em diferentes perfis de danos teciduais. Vários estudos em modelos experimentais e em humanos têm relatado o papel de citocinas como TNF- α (FERREIRA *et al.*, 2003; STAROBINAS *et al.*, 1991; TARLETON, 1988), IFN- γ (REED, 1988; GAZZINELLI, 1992), IL-10 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN 1996; SILVA *et al.* 1992) na regulação da resposta imunológica na DCh. Em um estudo utilizando camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e avaliados na fase aguda foi demonstrado que o IFN- γ produzido por células NK e IL-12 de origem macrófágica garantiram uma imunidade adaptativa protetora constituída de células T tipo 1 específicas para parasitas (ABRAHAMSOHN & COFFMAN 1996). Além disso, a secreção de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2), amplificação de atividade fagocítica de macrófagos, estímulo da proliferação de células B e produção de anticorpos além da diferenciação e ativação de células T CD8+ também são importantes para o controle da infecção (BRENER E GAZZINELLI, 1997, DOSREIS, 1997).

Outra citocina atuante na tentativa de controlar a infecção pelo *T. cruzi* é a IL-6. Em humanos e também na infecção experimental ocorre elevada expressão de IL-6 nos tecidos parasitados e na circulação e está associada a persistência da infecção (TRUYENS *et al.*, 1994; CHANDRASEKAR *et al.*, 1996).

Outro recurso utilizado pela resposta imune é o aumento da opsonização dos parasitos e morte dependente de complemento graças a uma forte resposta de anticorpos líticos devido a células B ativadas (LIDANI *et al.*, 2017; KRAUTZ *et al.*, 2000). Vale destacar que as células B também têm papel importante no equilíbrio inflamatório/anti-inflamatório. Camundongos deficientes nesse tipo de célula responderam ao *T. cruzi* com uma frequência aumentada de células T CD4⁺ produtoras de TNF- α acompanhado de uma diminuição nos fatores anti-inflamatórios (IL-10 e IL-17), que levaram à morte precoce devido à alta intensidade da inflamação (GOROSITO SERRÁN *et al.*, 2017).

A IL-27, membro da família de citocinas IL 12, é expressa por células apresentadoras de antígenos e estudos recentes também identificaram seu papel na DCh. Ela induz a diferenciação de diversas populações de células T e também regula IL-10. Em chagásicos humanos, a expressão de IL-27 foi significativamente associada à proteção cardíaca. (RIOS *et al.*, 2019)

Outro papel dessas citocinas/quimocinas é o de induzirem nos macrófagos a produção de superóxido (O₂⁻) e óxido nítrico (NO) que são radicais livres importantes para a morte direta do *T. cruzi* (MARTINS *et al.*, 1998). Assim, na fase aguda, uma intensa reação inflamatória é desencadeada por tais substâncias causando miocardite tanto em modelos animais quanto em pacientes.

Os dados citados anteriormente indicam que uma resposta protetora eficiente à infecção aguda por *T. cruzi* requer a liberação de citocinas relacionados a uma resposta Th1, além de produção de anticorpos que atuam de forma conjunta com fagócitos, células T auxiliares e linfócitos T citotóxicos.

Na ausência de qualquer um desses componentes, eventos patológicos podem surgir e estarão associados à persistência do parasito contribuindo para CCC e/ou insuficiência cardíaca no hospedeiro que são lesões característica da forma mais grave da DCh crônica. Por outro lado, a liberação excessiva de tais componentes favorece um ambiente próinflamatório exacerbado que também é frequentemente observado na DCh crônica. Um estudo utilizando camundongos e outro com pacientes cronicamente infectados sugeriram que uma possível exaustão imunológica das células T CD4⁺ e CD8⁺ podem contribuir para a redução da produção de citocinas favorecendo a persistência do parasito (MATEUS *et al.*, 2019; PÉREZ-ANTON *et al.*, 2018). Porém outros estudos indicam que a liberação de citocinas IFN- γ , IL-17, TNF- α se correlaciona com dano

tecidual e doença clínica observada em pacientes cronicamente infectados (CHEVILLARD *et al.*, 2018).

Já para a forma crônica indeterminada ocorre um aumento do número de células reguladoras e também na produção de IL-10, que promove a desativação de macrófagos e inibe os efeitos das células T e NKs (GOMES *et al.*, 2003; CUNHA-NETO *et al.*, 2009).

Em suma, os aspectos imunológicos e o perfil inflamatório da doença são extremamente complexos, com múltiplos mecanismos conhecidos e, em um cenário ideal, para controlar a infecção e proteger o hospedeiro, é necessário que haja um equilíbrio entre os mecanismos que atuam contra o parasito e a produção de mediadores químicos que evitam esta exacerbada resposta do sistema imune e, conseqüentemente, o dano tecidual.

2.3 - Tratamento etiológico na fase crônica: um problema ainda sem solução

Para diminuir o risco de morbidade e mortalidade, as pessoas infectadas pelo *T. cruzi* devem ser tratadas o mais cedo possível no curso de infecção. Assim, uma resposta favorável ao tratamento utilizando o BNZ depende muito do estágio de desenvolvimento da doença quando o tratamento é iniciado.

2.3.1 - Química e Farmacocinética do benznidazol

O benznidazol (BNZ) [N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-acetamida] possui fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_4O_3$ (massa molar 260,25 g / mol) e é um derivado da classe dos nitroimidazóis (figura 1) sendo atualmente, o único fármaco anti-*T. cruzi* disponível no Brasil (DE CASTRO, 2002). Apresenta-se como pó inodoro ou quase inodoro e deve ser armazenado em recipientes bem fechados. Praticamente insolúvel em água; fracamente solúvel em acetona; ligeiramente solúvel em metanol; ligeiramente solúvel em etanol (Pharmacopoeia WHO - site). Solubilidade de 3,550 mg/mL em acetato de etila e 24,741 mg/mL em acetonitrila, sendo classificados como ligeiramente solúvel (MAXIMIANO *et al.*, 2010). O BNZ é uma base fraca na faixa de pH fisiológico (pKa básico mais forte de 4,21) (DEL MORAL SANCHEZ *et al.*, 2018).

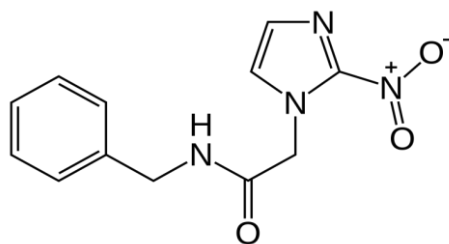


Figura 1: Estrutura molecular do benznidazol

O BNZ está disponível na clínica em comprimidos de 100 mg (uso adulto) e 12,5mg (uso pediátrico) e devem ser administrados 5 a 7 mg por kg de peso corporal diariamente, em adultos e crianças acima de 12 anos, duas vezes ao dia (após o café da manhã e após o jantar) pela via oral.

A absorção por via digestiva é rápida e praticamente total. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 horas. A meia-vida de eliminação plasmática ($t_{1/2\beta}$) é de 12 horas aproximadamente. O medicamento encontra-se no organismo principalmente sob a forma inalterada, sendo os metabólitos rapidamente eliminados pela urina e pelas fezes. (LAFEPE, 2013).

Apesar de ter sido desenvolvido há mais de 40 anos, ainda não há informações claras sobre sua farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD) (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2019). Em uma revisão sistemática da literatura e meta-análise foi demonstrado que seus parâmetros para dose única de 100mg são área sob a curva (AUC) = 51,31 mg.h/L, concentração máxima (C_{max}) = 2,19 mg/mL, tempo para C_{max} (T_{max}) = 2,93 h, meia-vida ($T_{1/2}$) de eliminação = 13,27 h, clearance (CL/F) = 2,04 L/h e volume de distribuição (Vd/F) = 39,19 L, dados que refletem os valores dos estudos individuais de farmacocinética clínica em adultos (WIENS *et al.*, 2016). Molina e cols (2017) relataram os parâmetros farmacocinéticos para o mesmo regime de dose em adultos e encontrou AUC em 46,4 $\mu\text{g h/ml}$, as concentrações plasmáticas de benznidazol atingiram o pico em 3,5 h; com concentrações máximas de 2,2 $\mu\text{g/ml}$, meia-vida terminal de 12,1 h, C_{max} entre 1,6 e 2,9 $\mu\text{g/ml}$ (homens vs. mulheres) e Vd entre 125,9 e 88,6 L (homens vs. mulheres). Os dados farmacocinéticos também foram relatados por Altcheh & cols (2014) em crianças recebendo 5–8 mg/kg/dia de BNZ por 60 dias. Nesta população pediátrica, os autores observaram valores medianos de K_a em $0,638\text{ h}^{-1}$ (0,34–1,52; IC 95%), Vd a

23,2 L (18,23-42,6; IC 95%), e aparente depuração total da droga do plasma após administração oral (CL/F) de 1,54 L/h (1,29–1,91; IC 95%).

A escassez de dados mais abrangentes sobre os parâmetros farmacocinéticos de diferentes populações dificultam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para DCh além de retardar o desenvolvimento de novas formulações contendo o BNZ. Nesse sentido, informações sobre meia-vida de absorção e eliminação, concentrações máximas e depuração total são úteis para ajustar as doses administradas e reduzir o risco de bioacumulação e toxicidade sistêmica (ALTCHEH *et al.*, 2014); (MOLINA *et al.*, 2017), que são fatores conhecidos por estarem associados à descontinuação do tratamento e menor eficácia terapêutica (URBINA, 2015); FERNANDÉZ *et al.*, 2016)

2.3.2 - Mecanismo de ação

No *T. cruzi*, o BNZ é ativado enzimaticamente por nitroreduases tripanossômicas tipo I (NTR), uma classe de enzimas insensíveis ao oxigênio presentes em vários protozoários parasitas, para os quais não há homólogo mamífero (PATTERSON; WYLLIE, 2014). Através de uma série de transformações que passam pela produção de hidroxilamina seguida de reações não enzimáticas, ocorre a liberação do dialdeído glioxal, um metabólito altamente reativo capaz de formar adutos com proteínas, DNA / RNA e pequenas moléculas como a glutatona. Esses metabólitos reativos são tóxicos, resultando em um efeito tripanocida rápido e localizado contra as formas intra e extracelular do parasita (WILKINSON; KELLY, 2009).

No entanto, alguns estudos indicam que a produção de glioxal não é o único mecanismo citotóxico para o BNZ. Um estudo empregando abordagens metabolômicas, mostrou que o BNZ é extensivamente metabolizado em uma série de metabólitos reativos em epimastigotas, mas os autores não foram capazes de detectar glioxal e adutos relacionados. Em vez disso, eles propuseram que a ligação covalente de múltiplos metabólitos reativos a tióis de baixo peso molecular (importante nas vias da glutatona e da tripanotona) é o principal modo de ação do BNZ contra o *T. cruzi* (TROCHINE *et al.*, 2014).

Outro efeito associado ao BNZ é a imunomodulação *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, que pode desempenhar um papel importante na patogênese da doença em humanos (MURTA *et al.*, 1999; LAMBERTUCCI *et al.*, 2017). Nesse sentido, há indução da atividade

fagocítica de macrófagos e células dendríticas, o que pode aumentar depuração do parasito (CALDAS *et al.* 2019; MAYA *et al.* 2007).

Além de sua atividade tripanocida, estudos anteriores indicam também que o BNZ afeta a síntese de marcadores biológicos envolvidos na inflamação (LAMBERTUCCI *et al.*, 2017) regulando negativamente a produção de NO e/ou na produção de interferon (IFN)- γ em macrófagos murinos estimulados (PIAGGIO *et al.*, 2001). Já em camundongos *knockout* para IFN- γ e IL-12, a resposta ao tratamento com BNZ foi reduzida quando comparado com camundongos *wild-type* (ROMANHA *et al.*, 2002).

2.3.3 - Efeitos adversos

As reações adversas do BNZ incluem dermatopatias por hipersensibilidade, distúrbios gastrointestinais, polineuropatia periférica, cefaleia, vertigem, fadiga (possivelmente pela formação de metabólitos tóxicos via enzima de metabolismo hepático CYP3A) e logo tempo de tratamento, acarretando a uma baixa adesão/aderência terapêutica (COURA; DIAS, 2009); (KEENAN; CHAPLIN, 2015).

2.3.4 - Falha terapêutica na fase crônica da DCh

O BNZ ainda não é considerado o fármaco ideal para alcançar a cura da DCh em razão de muitas limitações que incluem: variável resposta terapêutica (cura parasitológica em até 80% dos pacientes na fase aguda e 20% na fase crônica da doença), resistência das várias cepas e clones do parasito e elevada toxicidade.

Essas limitações podem estar relacionadas com propriedades farmacocinéticas inadequadas do fármaco, como baixa solubilidade e permeabilidade intestinal (LAMAS *et al.*, 2006) (URBINA, 2010); (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012) em provável consequência de suas propriedades físico-químicas (MAXIMIANO *et al.*, 2010), da autoindução dos seus sistemas de metabolização enzimática (CYP3A hepática e GST intestinal) e/ou transporte (P-gP e MRP2) (PERDOMO *et al.*, 2013). É proposto ser um composto de classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica com base em sua baixa solubilidade em água e coeficiente de partição (MAXIMIANO *et al.*, 2010).

Ainda assim, o tratamento com BNZ tem sido recomendado em todas as fases da doença: fase aguda (0-4 meses após a infecção), fase crônica recente (crianças de 0 a 14 anos, tratadas 4 meses após a infecção) e também tardia. Porém, as taxas médias de cura

obtidas em ensaios clínicos foram de 97,9% (infecção congênita, tratamento realizado de 0 a 6 meses de idade), 71,5% (fase aguda), 57,6% (fase crônica recente, crianças de 0 a 13 anos) e 5,9% (fase crônica tardia, grande maioria de pacientes entre 15 e 69 anos de idade) (GUEDES *et al.*, 2011). Esses dados confirmam a falha terapêutica e limitações para o tratamento durante a fase crônica sendo este um problema de solução complexa dadas as características multifatoriais da doença.

2.4 - O poder translacional do modelo cão na DCh

A determinação ampla e esclarecedora da farmacocinética do BNZ em modelos animais é essencial para o entendimento e predição dos seus efeitos farmacológicos e toxicológicos em estudos futuros e, para tal, diferentes modelos de experimentação tem sido utilizados como camundongo, rato, cão e ovelha (RAAFLAUB, 1980); (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979); (WHITE; WORKMAN; OWEN, 1982); (WORKMAN *et al.*, 1984); (MORILLA *et al.*, 2003); (MORILLA; PRIETO; ROMERO, 2005); (LEONARDI; BOMBARDIERE; SALOMON, 2013); (MARSON *et al.*, 2013); (ALTCHEH *et al.*, 2014); (DAVANCO; DE CAMPOS; PECCININI, 2015); (SOY *et al.*, 2015); (DAVANCO *et al.*, 2016); (FERNANDEZ; MARSON; RAMIREZ *et al.*, 2016); (MOLINA *et al.*, 2017) (PERIN *et al.*, 2017).

Ao consultar os dados na literatura, nota-se que, nos trabalhos de farmacocinética do BNZ utilizando diferentes modelos animais, há diferenças na dose, via de administração, veículo utilizado e idade dos animais. Além disso, a farmacocinética pré-clínica do BNZ ainda é pouco estudada e com resultados pouco esclarecedores (DAVANÇO *et al.*, 2015).

Camundongos Balb/c quando receberam uma dose intraperitoneal de 26 mg/Kg apresentaram $C_{máx} = 18 \mu\text{g/mL}$, $T_{max} = 15-30 \text{ min}$ e $T_{1/2} = 93 \text{ min}$; para doses de 78 mg/kg $C_{máx} = 36 \mu\text{g/mL}$, $T_{max} = 15-30 \text{ min}$, $T_{1/2} = 96 \text{ min}$. Para doses de 650 mg/kg $C_{máx} = 105 \mu\text{g/mL}$, $T_{max} = 60 \text{ min}$ e 4,8-5,2% da dose excretada na urina após 24h. A razão concentração cérebro/plasma foi de 61-76%. De forma geral, a $T_{1/2}$ de eliminação foi de 90 min independente da dose e a ligação às proteínas plasmáticas foi de 38% (WORKMAN *et al.*, 1984). Em experimento semelhante, Walton e cols (1987) determinaram que 24h após a administração de 650 mg/kg de BNZ 5% do fármaco é encontrado na urina sendo 3% encontrado como amina (WALTON; WORKMAN, 1987). Camundongos Swiss, de quatro meses de idade, tratados oralmente com 5 mg de BNZ

apresentaram $C_{\text{máx}} = 151 \mu\text{g/Kg}$, $T_{\text{max}} = 2,2 \text{ h}$ e $T_{1/2} = 1,64 \text{ h}$, $CL/F = 416,74 \text{ ml/h.Kg}$ e $V_d/F = 2.112,33 \text{ mL/Kg}$ (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012).

Leonardi e cols (2013), por sua vez, ao tratarem o modelo rato com a dose de 10 mg/kg por via oral relataram $C_{\text{max}} = 665,2 \text{ ng/ml}$; $T_{\text{max}} = 2 \text{ h}$; $AUC = 455,7 \text{ ng.h/mL}$; Davanço e colaboradores (2015) ao utilizarem o dobro da dose (20 mg/kg) demonstraram $C_{\text{max}} = 11 \mu\text{g/mL}$; $T_{\text{max}} = 1,1 \text{ h}$; $T_{1/2} = 2,7 \text{ h}$; $AUC_{0-\infty} = 65,6 \mu\text{g.h/mL}$; $CL/F = 65,9 \text{ mL/h}$ e $V_d/F = 253,5 \text{ mL}$ (DAVANÇO *et al.*, 2015).

No modelo cão, Workman e cols (1984) trataram com as doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg pela via oral e observaram uma grande variabilidade entre indivíduos. De forma geral, os animais tratados com as doses de 25 e 50 mg/kg apresentaram C_{max} entre 38,9-59,8 $\mu\text{g/mL}$; T_{max} entre 3-5h; $T_{1/2}$ entre 6-10 h e ligação às proteínas de 52-59%. Além disso, os cães quando tratados com a dose de 25 mg/kg apresentaram média de 41,5% na relação concentração tecido/plasma entre 1 a 4 h (WORKMAN *et al.*, 1984).

Ao contrário do observado na clínica, os experimentos pré-clínicos apresentam variações nos parâmetros farmacocinéticos sendo, portanto, necessário escolher um modelo animal que apresente valor translacional de modo a permitir sua extrapolação para humanos.

Sendo assim, as evidências científicas revelaram-se úteis como critério de seleção do modelo canino para a investigação farmacocinética do BNZ, uma vez que neste modelo há semelhança dos mecanismos imunopatogênicos bem como dos resultados de eficácia deste fármaco quando comparados à doença de Chagas humana (DE LANA; CHIARI; TAFURI, 1992; GUEDES *et al.*, 2002; DINIZ *et al.*, 2010; SANTOS *et al.* 2012; CHATELAIN & KONAR, 2015; SANTOS *et al.*, 2016; CHATELAIN & SCANDALE, 2020; DE LANA & GIUNCHETTI, 2021). Apenas WORKMAN (1984) propôs a avaliação do perfil farmacocinético do BNZ para o modelo cão, entretanto foi possível observar certas limitações relacionadas ao desenho de estudo.

Assim como nos humanos, os cães sobrevivem à fase aguda e evoluem para a fase crônica. Em geral, a forma clínica indeterminada da DCh crônica é facilmente reproduzida nesta espécie bem como a forma cardíaca, sendo esta última dependente da cepa utilizada (DE LANA, 2017). Dessa forma, o modelo cão, foco desse trabalho, apresenta um importante valor translacional e contribuirá consideravelmente para este estudo.

Por todos os aspectos abordados anteriormente é pertinente afirmar que torna-se essencial o estudo da influência de fatores extrínsecos (propriedades físico-químicas, alimento, interação medicamentosa, fitoterápicos e plantas medicinais e etc.) e intrínsecos (idade, sexo, obesidade, ciclo circadiano, polimorfismo genético, infecção aguda e crônica com diferentes cepas do *T. cruzi* e etc.) na farmacocinética em diferentes doses e/ou regimes de dose do BNZ visto que tais influências ainda não estão bem estabelecidas ou não há informações na literatura. A partir dessa melhor compreensão, seria possível propor estratégias que busquem otimizar a farmacoterapia da DCh.

3 - JUSTIFICATIVA

Considerando que: (i) a alta variabilidade na eficácia e segurança do benznidazol no tratamento padrão da DCh, especialmente na fase crônica, pode ser devido a propriedades farmacocinéticas inadequadas; (ii) o benznidazol é o fármaco de primeira escolha em todo o mundo e o único disponível para o tratamento da DCh no Brasil; (iii) na infecção pelo *T. cruzi* há alterações nas concentrações de citocinas; (iv) já está bem estabelecido que citocinas podem alterar a expressão e a atividade de enzimas de metabolismo hepático (ex.: CYP 450) e proteínas transportadoras de membrana (ex.: P-gp), como no câncer, na insuficiência cardíaca, nas doenças auto-imunes (psoríase e esclerose múltipla), mas para doenças parasitárias humanas estas informações são escassas e restritas, até o momento, a malária e leishmaniose visceral. O presente estudo propôs pela primeira vez compreender se o processo inflamatório da infecção pelo *T. cruzi* é capaz de influenciar a disposição cinética do BNZ no modelo cão, no intuito de contribuir para o delineamento de uma farmacoterapia mais racional para os pacientes portadores da DCh.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo Geral

Avaliar a influência da infecção experimental pelo *T. cruzi* na farmacocinética do benznidazol no modelo cão.

4.2 - Objetivos Específicos

- I. Desenvolver e validar o método de análise do benznidazol em soro de cão;
- II. Avaliar a farmacocinética de dose múltipla oral 3,5 mg/Kg/12h de benznidazol em soro de cão infectado pelo *T. cruzi* na fase aguda da doença;
- III. Avaliar a farmacocinética de dose múltipla oral 3,5 mg/Kg/12h de benznidazol em soro de cão infectado pelo *T. cruzi* na fase crônica da doença;
- IV. Avaliar a influência das fases aguda e crônica da doença de Chagas na farmacocinética de dose múltipla oral 3,5 mg/Kg/12h de benznidazol em soro canino;
- V. Avaliar as concentrações séricas de citocinas nos cães nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*;
- VI. Determinar a carga parasitária do *T.cruzi* em sangue nos cães nas fases aguda e crônica da infecção.

5 - Materiais e métodos

5.1 - Aspectos éticos

O protocolo de pesquisa nº 2017/38 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto-MG (CEUA/UFOP) e, posteriormente, foi encaminhado para o Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA/UFOP) local da realização dos experimentos (Anexo 1).

5.2 - Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi obtido por meio do programa *PS: Power and Sample Size Calculation*, versão 3.1.2 (2014), empregando os parâmetros farmacocinéticos do BNZ oriundos de cães saudáveis tratados com dose única do fármaco (WORKMAM *et al.*, 1984). Nossa hipótese de trabalho foi que as citocinas oriundas dos processos inflamatórios agudo e crônico, provocados pela infecção experimental com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, elevariam em pelo menos 30% a área sob a curva concentração pelo tempo (AUC) do BNZ no modelo cão. Para o cálculo do tamanho amostral o nível de significância foi fixado em 5%, o poder do teste em 80% e a média \pm desvio padrão de AUC do BNZ de $772,75 \pm 57,2$ $\mu\text{g.h/mL}$ (Figura 2). Vale ressaltar que pelo histórico de controle do nosso grupo de pesquisa, já é sabido que a doença pode elevar a mortalidade dos animais infectados, para tanto seriam necessários que, em cada grupo de tratamento, fossem incluídos mais dois animais, o que aumentaria o tamanho amostral para 6 cães por grupo ($n=6$), para que no fim do experimento cada grupo fosse contemplado com no mínimo 4 cães.

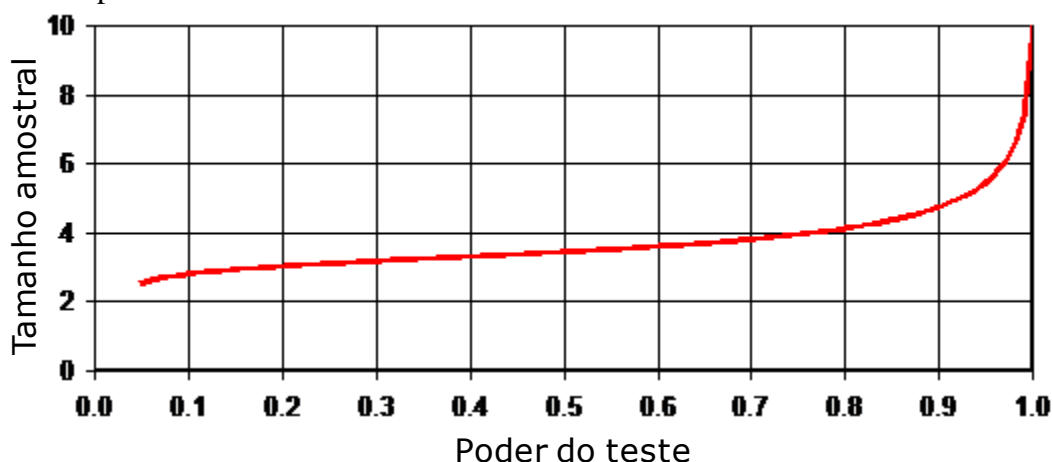


Figura 2 - Gráfico do tamanho da amostra em função do poder do teste.

5.3 – Animais

Foram investigados trinta (33) cães sem raça definida (SDR) [quinze (15) machos e dezoito (18) fêmeas] com idade entre 04 a 10 meses, e peso entre 10 a 30 kg. Os cães foram mantidos no canil do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.4 - Inóculo e infecção

A obtenção do inóculo com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* foi realizada no 14º dia de infecção em camundongos *Swiss* (pico de parasitemia para cepa Be-78), mediante retirada do sangue do plexo orbital. Em cada passagem, o número de formas tripomastigotas foi determinado de acordo com a técnica descrita por Brener (1962). Para o seu ajuste foi usado PBS estéril pH 7,2. Após 3 passagens sucessivas, formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas para inoculação dos grupos experimentais.

Com a obtenção dos inóculos padronizados, os cães foram inoculados (infectados experimentalmente) pela via intraperitoneal com 2.000 tripomastigotas sanguíneas da cepa Be-78 por quilograma de peso corporal.

Após a confirmação da infecção, os animais foram avaliados diariamente quanto aos sinais clínicos e mudanças comportamentais, e a parasitemia realizada diariamente segundo Brener (1962) até 5 dias depois da primeira negatificação.

5.5 - Protocolo Experimental

O protocolo experimental da presente tese é oriundo do estudo “*Influência da doença de Chagas na farmacocinética e biodistribuição do benznidazol, na atividade de enzimas do sistema citocromo P-450 e do transportador de membrana glicoproteína-P no modelo cão*”. A seguir é apresentado o delineamento experimental do estudo completo (Figura 3) e o protocolo experimental utilizado na presente tese (Figura 4).

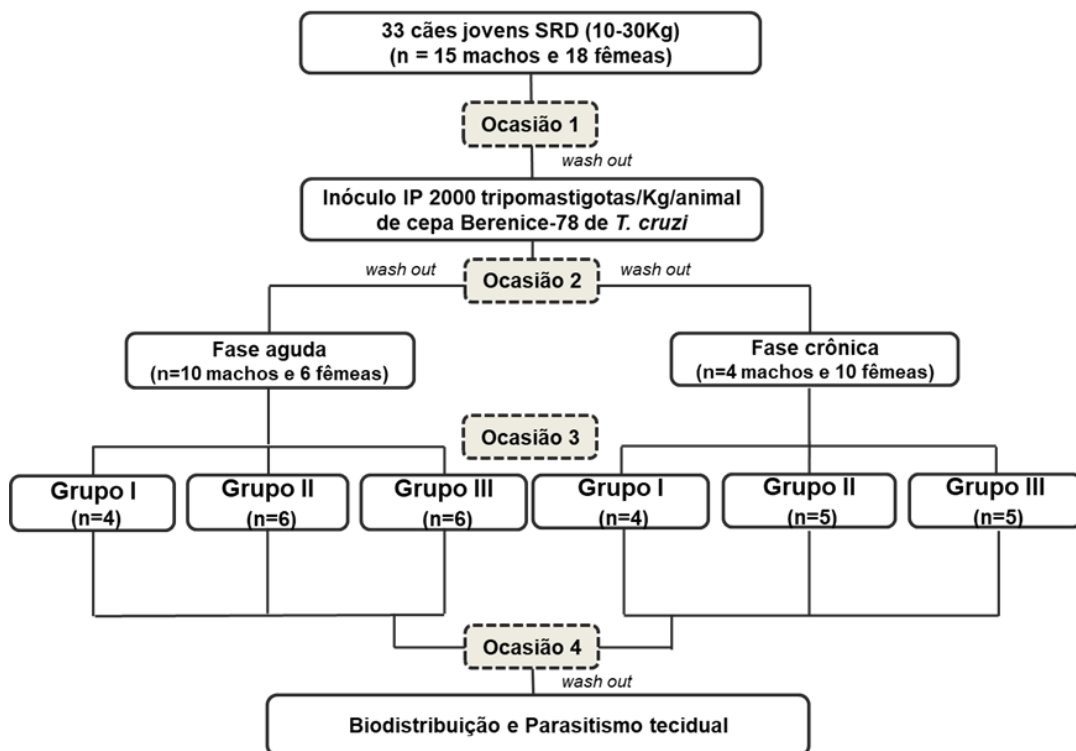


Figura 3 - Delineamento experimental. **Ocasão 1** (Antes da Infecção): coleta seriada de sangue nos tempos 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10 e 12 h para análise Fenotípica e perfil de citocinas. **Ocasão 2** (Após infecção, antes de iniciar o tratamento): coleta seriada de sangue conforme a Ocasão 1 e carga parasitária. **Ocasão 3** (Após 10, 30, 40 e 60 dias da administração do benznidazol): coleta seriada de sangue conforme a Ocasão 2 e para análise farmacocinética do benznidazol. **Ocasão 4** (Após 30 dias do término do tratamento com benznidazol): coleta seriada de sangue conforme a Ocasão 2. Wash out: período de 3 a 5 dias entre ocasiões.

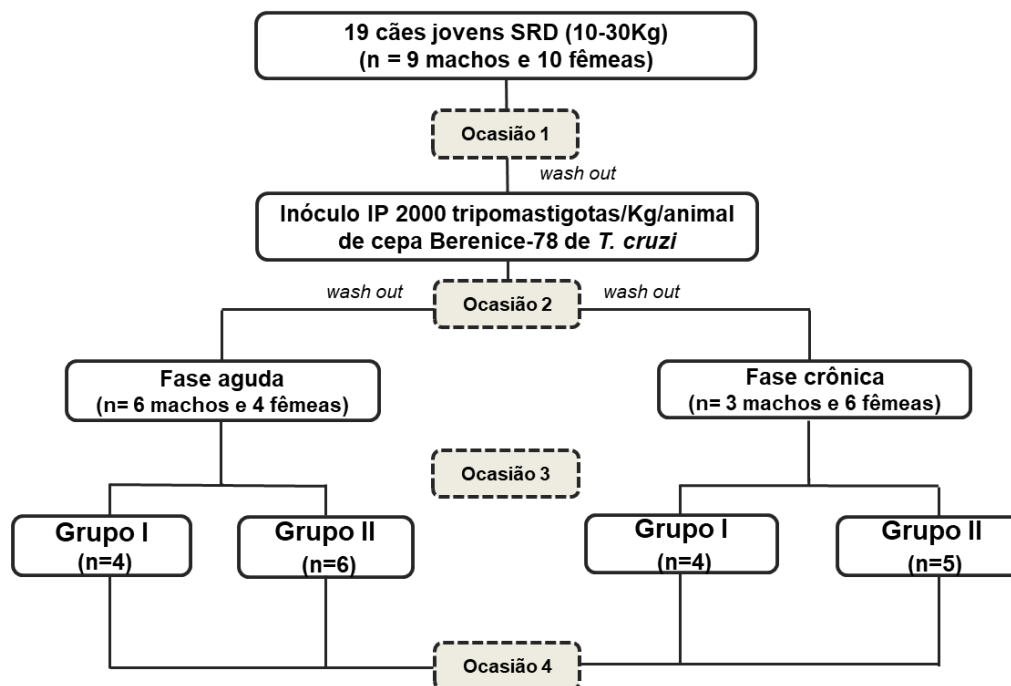


Figura 4 - Protocolo experimental da tese. **Ocasão 1** - Antes da Infecção: Análise do perfil de citocinas IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α . **Ocasão 2** - Após infecção, antes de iniciar o tratamento: Análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e de carga parasitária. **Ocasão 3** - Após 10, 30, 40 e 60 dias da administração do benznidazol: Análise dos parâmetros farmacocinéticos, análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e de carga parasitária. **Ocasão 4** - Após 30 dias o término do tratamento com benznidazol: Análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e de carga parasitária.

Todas as amostras do estudo completo foram coletadas e a presente tese incluiu uma parte dos experimentos de acordo com o protocolo a seguir:

Dez (10) cães foram randomicamente selecionados para compor o grupo Fase aguda (até 1 mês após infecção) e nove (9) cães foram randomicamente selecionados para compor o grupo Fase crônica (a partir de 12 meses após infecção). Para cada fase de infecção os animais foram distribuídos em dois grupos quanto à instituição ou não do tratamento com BNZ (Figura 4)

Fase Aguda (n=10)

- Grupo I ou controle (n=4, 2 machos e 2 fêmeas): animais infectados e não tratados;
- Grupo II (n=6, 4 machos e 2 fêmeas): dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ durante 60 dias consecutivos.;

Fase Crônica (n=9)

- Grupo I ou controle (n=4, 2 machos e 2 fêmeas): animais infectados e não tratados;
- Grupo II (n=5, 1 macho e 4 fêmeas): dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ durante 60 dias consecutivos.;

O estudo na Fase aguda e Fase crônica foi dividido em 4 ocasiões conforme descrito a seguir (Figura 4):

- Ocasão 1: Antes da infecção;
- Ocasão 2: Após infecção, antes de iniciar o tratamento;
- Ocasão 3: Após 10, 30, 40 e 60 dias da administração do BNZ;
- Ocasão 4: Após 30 dias do término do tratamento com BNZ.

Antes, entre e após cada ocasião do estudo foram realizados exames clínicos veterinários e coletadas amostras de sangue para avaliação hematológica e bioquímica dos cães de ambas as fases da infecção.

Na Ocasão 3, os cães do Grupo II da fase aguda receberam o tratamento com BNZ a partir do primeiro dia de parasitemia patente, confirmada por exame de sangue a fresco (ESF). Enquanto que os cães do Grupo II da fase crônica somente receberam tratamento com BNZ após 12 meses de infecção.

O BNZ utilizado no estudo foi adquirido do Laboratório LAFEPE (comprimidos de 100 mg). A forma farmacêutica do tipo cápsula foi preparada utilizando pó oriundo de trituração de comprimidos de BNZ para obtenção de dose individualizada com base no peso corporal de cada cão. A manipulação das cápsulas foi realizada em Farmácia Magistral (Acurácia Farmacêutica – Mariana-MG; Farmacêutica responsável – Lorena Cera Bandeira, CRFMG-16195), ou seja, seguindo Boas Práticas de Manipulação em

Farmácia e Controle de Qualidade. A administração do fármaco por via oral foi realizada com uso de provendas (palatabilizantes), estimulando o reflexo de deglutição/tosse pela compressão manual do terço médio da traqueia para garantir a ingestão da cápsula. Os animais não foram submetidos ao jejum ou restrição hídrica antes da administração dos fármacos.

Em ambas as Fases de infecção foram realizadas o *wash out* entre todas as ocasiões do estudo. O *wash out* foi caracterizado por um período mínimo de 3 a 5 dias que visou à eliminação dos fármacos utilizados no estudo, bem como o restabelecimento dos animais em experimentação, para início de uma nova ocasião.

As amostras seriadas de sangue foram coletadas nos tempos 0 (zero); 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4, 6, 8, 10 e 12 horas após a administração do BNZ.

Nas Ocasões 1, 2, 3 e 4 foram coletadas de todos os grupos experimentais das Fases aguda e crônica amostras de sangue 2 h após administração do BNZ para avaliação das concentrações séricas das citocinas.

Nas Ocasões 2, 3 e 4 foram coletadas amostras de sangue para quantificação da carga parasitária.

5.6 - Avaliação parasitológica por exame a fresco

A avaliação parasitológica por exame de sangue a fresco foi realizada para confirmação de infecção nos animais e determinação da fase da infecção. A contagem de formas tripomastigotas sanguíneas foi realizada diariamente a partir do 10º dia após a infecção até a negatificação do exame de sangue à fresco por cinco dias consecutivos (BRENER, 1962). A metodologia de contagem de tripomastigotas consiste em retirar 5 μL (5mm^3) de sangue da veia marginal da orelha dos cães, colocar sob uma lamínula de 22 x 22 mm e analisar ao microscópio (objetiva de 40x e ocular de 10x) seguido da leitura de 50 campos aleatórios do microscópio. O número de tripomastigotas encontrados deve ser multiplicado pelo fator de correção do microscópio.

5.7 - Coleta de sangue e obtenção das amostras

O método de coleta de sangue utilizado em todo o estudo foi à punção da veia cefálica. A contenção do animal foi realizada com uso de cordas de algodão e mãos para amordaçar a boca. Após garrotear a pata dianteira do animal, foi realizada a assepsia do local a ser puncionado com algodão embebido em álcool 70° Gl. Aspirou-se o sangue e após retirar a agulha, pressionou-se a região com algodão umedecido com água oxigenada 20 volumes.

Antes, entre e após as Ocasões do estudo foram colhidas amostras de aproximadamente 10 mL de sangue venoso em seringa não heparinizada para avaliação hematológica e bioquímica dos cães. Uma alíquota foi transferida para tubos de 5 mL com gel ativador de coágulo (Olen[®]), centrifugada (2500 rpm por 10 minutos a 4°C / centrífuga refrigerada Eppendorff[®] modelo 5810r) e armazenada a - 20° C para posterior análise bioquímica. A outra alíquota foi transferida para tubos de 5 mL com EDTA K₂ (Olen[®]) para análises hematológicas.

As amostras seriadas de sangue para a determinação das concentrações séricas do BNZ, e para a avaliação do perfil de citocinas foram coletadas nos tempos pré-determinados no protocolo experimental (Figura 4). Durante cada coleta foram retirados 5 mL de sangue em seringa não-heparinizada e transferidos para tubo com gel ativador de coágulo (Olen[®]) previamente identificados, acondicionado em caixa térmica com gelo e encaminhado para o Laboratório de Imunopatologia (LIMP) do NUPEB/UFOP. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação (2500 rpm por 10 minutos a 4° C / centrífuga refrigerada Eppendorff[®] modelo 5810r). Todas as amostras foram armazenadas a - 80° C até o momento da análise.

Para a quantificação da carga parasitária foram coletados 200 µL de sangue venoso que foi posteriormente transferido para tubos tipo *Eppendorf* contendo EDTA onde foram mantidos sob refrigeração em geladeira (4 °C) até a extração do material genético realizada no mesmo dia da coleta.

5.8 - Análise hematológica e bioquímica no soro canino

A avaliação hematológica (Eritrograma e Leucograma completos) e bioquímica [Alanina Lactato Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Gama Glutamil Transferase (GGT), Creatinina fosfoquinase-CPK (CK-NAC e CK-MB), Uréia

e Creatinina séricas] dos cães na fase aguda e na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* foram realizadas no Setor de Bioquímica do LIMP-NUPEB/UFOP, sob a responsabilidade técnica da farmacêutica Lucia Gomes de Araújo. Justifica-se a realização desses exames para acompanhamento clínico veterinário, e frente à possibilidade de que alterações nos respectivos órgãos/sistemas poderiam influenciar na farmacocinética do BNZ.

5.9 - Análise do benznidazol em soro empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

O método de análise do BNZ em soro empregando CLAE-DAD foi desenvolvido com base no procedimento analítico anteriormente desenvolvido e validado em plasma de camundongo (PERIN *et al.*, 2017) pelo nosso grupo de pesquisa.

Soluções padrão e Reagentes

A solução estoque de cloridrato de benznidazol (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 4000 µg de base livre/mL de acetonitrila (ACN). A partir dessa solução foram realizadas diluições para obtenção das soluções de uso, nas concentrações 2; 4; 10; 20; 100, 200; 400; 500; 1000 e 2000 µg de BNZ/mL de ACN. A solução de omeprazol (padrão interno - PI, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 2000 µg de base livre/mL de ACN e diluída para 200 µg/mL de ACN. Todas as soluções padrão foram armazenadas a - 20° C.

Os solventes empregados para diluição das soluções padrão, preparo da fase móvel e das amostras foram obtidos da J. T. Baker (Fairfield, EUA) como grau de cromatografia.

A água ultrapura utilizada nos experimentos foi obtida em sistema de purificação Milli-Q Direct 8[®] (Millipore, Molsheim, França).

Análise cromatográfica

A determinação da concentração total de BNZ foi realizada por CLAE-DAD. O sistema CLAE foi constituído por cromatógrafo da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, auto injetor modelo SIL-20A HT, forno CTO-20A e sistema controlador modelo SCL 20A, equipado com detector DAD modelo SPD-M20A operando a 324 nm.

Preparo das amostras (Precipitação de proteínas)

As amostras de soro branco foram obtidas dos cães incluídos neste estudo. Foram coletadas amostras de soro de todos os cães em dias e horários distintos (não tratados com BNZ), sendo posteriormente feita a mistura destes soros (*pool* de soro).

Em tubos cônicos de 1,5 mL, alíquotas de 100 µL de soro foram enriquecidas com 5 µL da solução de padrão interno (omeprazol). As misturas foram acrescidas com 500 µL de acetonitrila e agitadas por 10 minutos em agitador tipo vórtex. A seguir, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13.800 rpm. As fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL e evaporadas a vácuo usando evaporador rotatório. Os resíduos foram reconstituídos com 100 µL da fase móvel, agitados por 1,5 minutos em agitador tipo vórtex, centrifugados por 5 minutos a 13.800 rpm, e então 85 µL do sobrenadante foram coletados e 20 µL submetidos à análise cromatográfica.

5.10 - Validação do método de análise do benznidazol em soro

O método de análise do BNZ em soro de cão foi validado de acordo com guia da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos, sendo os seguintes parâmetros avaliados: efeitos matriz e residual, limite de quantificação, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, seletividade e estabilidade.

Curvas de calibração em soro

As curvas de calibração foram construídas em triplicata utilizando alíquotas de 100 µL de soro branco enriquecidas com 5 µL de cada solução padrão de uso de BNZ e do PI e submetidas aos respectivos processos de extração descritos anteriormente. Assim, as concentrações de BNZ foram de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 20; 25; 50 e 100 µg/mL de soro.

As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação foram obtidos das razões das áreas dos picos plotadas (padrão/PI) em função das respectivas concentrações séricas.

Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi estabelecido para BNZ em 0,1 µg/mL de soro. A partir disso, foram realizadas análises de 10 replicatas destas concentrações para verificar se estas se enquadrariam nos valores determinados de precisão e exatidão. O LIQ foi definido como a menor concentração sérica analisada com Coeficiente de variação (CV) e erro padrão relativo (EPR) inferiores a 20%.

A linearidade foi definida como a maior concentração sérica (limite superior de quantificação) que apresentou relação linear com a resposta do detector na situação de inclusão do LIQ. Foram avaliadas amostras de soro enriquecidas com concentrações crescentes de BNZ (em triplicata para cada concentração) em relação às empregadas na construção das curvas de calibração e, a seguir, submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica.

O método foi considerado linear para BNZ nos intervalos de 0,1 - 100 µg/mL. Para a aprovação das curvas, os padrões de calibração deveriam apresentar um desvio de até 15% e o LIQ um desvio de até 20%. O coeficiente de correlação linear deveria ser igual ou superior a 0,98.

Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado com 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada de matriz adicionada de BNZ em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (200 µg/mL soro).

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI.

Amostras de controle da qualidade em soro

As amostras de controle da qualidade (CQs) consistem em uma amostra de matriz branco (soro), adicionada de BNZ em concentrações específicas, usadas para validar e monitorar o desempenho do método bioanalítico. Existem 4 tipos de amostras de controle da qualidade: controle da qualidade de baixa concentração, média concentração, alta concentração e de diluição.

O controle da qualidade de baixa concentração (CQB) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ até 3 vezes o limite inferior de quantificação (LIQ), ponto mais baixo da curva analítica. O controle da qualidade de média concentração (CQM) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ próxima à média entre o ponto mais alto e o mais baixo da curva. O controle da qualidade de alta concentração (CQA) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ entre 75% e 85% do maior ponto da curva analítica. O controle da qualidade de diluição (CQD) representa uma amostra de matriz adicionada de uma concentração de BNZ acima do ponto máximo da curva analítica. Essa amostra é utilizada para analisar amostras de cães que poderiam ultrapassar o limite superior da curva. Dessa maneira é realizada uma diluição pré-definida tanto do controle quanto da amostra para posterior processamento e análise.

Considerando o amplo intervalo de concentrações séricas da curva de calibração, o controle da qualidade de média concentração (CQM) foi desmembrado em controle da qualidade médio alto (CQMA) e controle da qualidade médio baixo (CQMB). O controle da qualidade médio alto (CQMA) consiste numa amostra preparada com uma concentração de fármaco entre o ponto mais alto e o ponto médio da curva, e o controle da qualidade médio baixo (CQMB) representa uma amostra com uma concentração de fármaco entre o ponto mais baixo e o ponto médio da curva. Os controles da qualidade foram preparados nas concentrações de BNZ de 0,2 (CQB), 1,0 (CQMB), 20 (CQMA), 80 (CQA) e 200,0 (CQD) $\mu\text{g/mL}$ de soro.

Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% do total de CQs e no mínimo 50% dos CQs de cada concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15% em relação aos seus respectivos valores nominais. Os controles da qualidade para análise das amostras em soro foram armazenados à - 20° C até a análise.

Efeito Matriz

Efeito Matriz é um estudo realizado para verificar se há supressão iônica ou aumento de resposta do fármaco em análise ou do padrão interno devido à interferência de algum componente endógeno presente na matriz biológica. Para a sua realização foram utilizadas mistura de amostras de soro de todos os cães incluídos neste estudo. Estas amostras foram coletadas em dias e horários distintos (incluindo amostras hemolisadas), no intuito de aumentar a variabilidade na qualidade do soro, uma vez que não foi possível obter especificamente 4 amostras de plasma normal, 2 lipêmicos e 2 hemolisados, como recomendado pela ANVISA. Os soros foram processados de acordo com o descrito em “Preparo de amostras”. O PI e o BNZ foram acrescentados após o processamento, nas mesmas concentrações das amostras de CQB (0,2µg de BNZ/mL de soro) e CQA (80µg de BNZ/mL de soro). Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação a seguir:

$$FMN = \frac{(\text{resposta do analito em matriz})/(\text{resposta do PI em matriz})}{(\text{resposta do analito em solução})/(\text{resposta do PI em solução})}$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%. O CV é expresso em porcentagem e calculado conforme a equação abaixo:

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Recuperação

A recuperação foi avaliada em quintuplicata em amostras de soro enriquecidas com soluções padrão CQB e CQA de BNZ. As amostras foram analisadas como acima descrito e a recuperação calculada por meio da comparação direta das áreas dos picos das amostras extraídas com as áreas dos picos obtidos de soluções padrão adicionadas a extratos de soro branco.

Precisão e exatidão

O estudo de precisão é dividido em precisão intracorrída e precisão intercorrídas. Foram utilizadas amostras de CQD, CQA, CQMA, CQMB, CQB e o LIQ em soro de acordo com o descrito em “Amostras de controle da qualidade”. As soluções preparadas em soro foram armazenadas a - 20° C até a análise. Para o estudo de precisão intracorrída analisou-se 5 replicatas de cada controle da qualidade e uma curva de calibração. O estudo de precisão intercorrídas foi composto por análises realizadas em 3 dias diferentes. Para que o método seja considerado preciso, o coeficiente de variação entre os CQs de mesmas concentrações deve ser igual ou inferior a 15%, exceto o LIQ, que aceita um CV de até 20%. O estudo de exatidão intracorrída e intercorrídas foi realizado da mesma maneira que o estudo de precisão, porém o seu cálculo é baseado no Erro Padrão Relativo (EPR), obtendo então valores de até 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, que aceita um EPR de até 20% do valor nominal. O EPR é calculado conforme a equação a seguir:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração teórica})}{(\text{Concentração teórica})} \times 100$$

Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta duração. Para a avaliação da estabilidade do BNZ foram utilizados os controles da qualidade CQB e CQA.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, os controles da qualidade foram congelados a - 20° C por 24 h, a seguir foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídas e analisadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, os controles da qualidade passaram pelo processo de extração e, em seguida foram mantidos no auto-injetor a 21° C por 24 horas antes da injeção no sistema cromatográfico.

Para a avaliação da estabilidade de curta duração os controles da qualidade foram mantidos na bancada do laboratório em temperatura ambiente por 4 horas. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

Os resultados das análises dos controles da qualidade foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém-preparadas (valor nominal), sendo expressos em porcentagem de desvio, e devendo estar dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal.

5.11 - Análise farmacocinética do benznidazol

Os parâmetros farmacocinéticos do BNZ foram calculados a partir das concentrações séricas ao longo do tempo de 12 h de coleta das amostras empregando o software Phoenix 64 / WinNonLin versão 7.0 (Pharsight, CertaraTM Company).

Foram avaliados os seguintes parâmetros de exposição: C_{\max} (concentração sérica máxima), T_{\max} (tempo para alcançar C_{\max}), C_{\min} (concentração sérica mínima), AUC_{0-12} (área sob a curva concentração sérica *versus* 12h), $t_{1/2el}$ (meia-vida de eliminação), C_{ss} (concentração no estado de equilíbrio), Vd/F (volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio), CL/F (*clearance* total aparente no estado de equilíbrio), K_{el} (constante de velocidade de eliminação), Flutuação (diferença entre concentração plasmática máxima e mínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h).

5.12 - Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software R: *A language and environment for statistical computing*, versão 3.4.3 (R foundation for statistical computing, Viena, Áustria, 2014) para obtenção da mediana e intervalo interquartil 25-75% (IQ 25-75%), com nível de significância fixado em 5%.

5.13 - Pesquisa de citocinas séricas pela ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

A ELISA foi realizada segundo protocolo apresentado na bula do kit da R&D Systems para pesquisa de IL-6, IFN- γ , IL-10 e TNF- α e para tal foram necessárias as seguintes soluções: *solução de lavagem* (PBS 1x pH 7,4 + TWEEN 20 - 1L de PBS + 500 μ L de TWEEN 20), *diluyente ou solução de bloqueio* (PBS 1x, pH 7,4 + 1%BSA), *solução de parada* (H₂SO₄ 1M), *solução de diluição de anticorpo de captura* (PBS 1x, pH 7,4 estéril) e *solução de diluição recombinante / solução diluição biotilado* (PBS 1x, pH7,4 + 1% BSA).

Inicia-se com a diluição do anticorpo de captura para a concentração de uso em PBS 1x. Adiciona-se 50 μ L do anticorpo de captura diluído na placa de 96 poços (MAXiSorp NUNC). Selar a placa e incubar *overnight* na temperatura ambiente.

Lavar a placa com a solução de lavagem PBS+Tween por três vezes e secar a seguir. Bloquear a placa com 200-300 μ L do reagente diluyente em cada poço e incubar em temperatura ambiente no tempo de 1 hora. A seguir, faz-se novamente o processo de lavagem e secagem até que se complete 3 vezes.

Para a realização do ensaio adiciona-se 50 μ L da amostra deixando incubar por 2 horas a temperatura ambiente (selar a placa). Proceder com a lavagem e secagem da placa como já descrito. Inserir 50 μ L do anticorpo de detecção diluído no reagente diluyente e incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Realizar nova lavagem e secagem da placa.

Posteriormente, adicionar 100 μ L da Streptavidin-HRP diluída em cada poço, cobrir a placa, proteger da luz e incubar por 20 minutos em temperatura ambiente. Lavar e secar e após, adicionar 100 μ L da solução de substrato (TMB) e incubar por 20 minutos na temperatura ambiente. Proteger da luz

Adicionar a solução de paragem em cada poço e realiza-se a leitura da placa no leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmar os padrões de normalidade. Para os dados classificados como não-paramétricos foi realizada a análise de Mann-Whitney (entre a fase aguda e crônica) ou de Kruskal-Wallis seguida pelo teste

de Dunns (entre os grupos em uma mesma fase da infecção). Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de $p < 0,05$.

5.14 - Quantificação da carga parasitária por qPCR

Extração sangue

As amostras foram submetidas aos procedimentos de extração do DNA utilizando o kit *DNeasy[®] Blood and Tissue Kit* (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante: 100 μ L de sangue foram transferidos para tubos de 1,5 mL, posteriormente, foram adicionados 20 μ L de *Proteinase K* (Sigma-Aldrich[®], USA), 100 μ L de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril e 200 μ L de *Tampão AL*. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio do vortex (*Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA*) por 10 s e incubadas em banho seco a 56 °C por 10 min (Accublock Digital Dry Bath / Labnet). Após este período, foram adicionados 200 μ L de etanol (96-100 %) às amostras que foram novamente homogeneizadas e logo após transferidas para a coluna *DNeasy Mini* colocada sobre um *tubo coletor*. Esse conjunto foi centrifugado por 1 min a 6.000 x g (Microcentrífuga Eppendorf[®] Modelo 5418, NY, USA). Foi descartado o *tubo coletor* e colocada a coluna *DNeasy Mini* sobre um novo *tubo coletor*.

Em seguida, foram adicionados 500 μ L de *Tampão AW1* seguido de centrifugação por 1 min a 6.000 x g. Foi descartado o *tubo coletor*, colocada a coluna *DNeasy Mini* sobre um novo *tubo coletor*, adicionado de 500 μ L de *Tampão AW2* seguida de centrifugação as amostras por 3 min a 20.000 x g. Novamente foi descartado o *tubo coletor* e a coluna *DNeasy Mini* transferida para um tubo tipo *Eppendorf*. O DNA foi eluído adicionando 30 μ L de *Tampão AE* na coluna *DNeasy Mini* e centrifugando o conjunto por 1 min a 6.000 x g (procedimento realizado duas vezes). Por fim, foi realizada a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA*) e após a dosagem as amostras armazenadas a - 20 °C e foram mantidas nessas condições até o momento da análise.

Curva padrão e determinação da carga parasitária por qPCR

Inicialmente foi preparada uma curva padrão para que seja possível determinar o número de cópias do DNA do parasito. Neste sentido, utiliza-se epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) cultivadas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), até atingir o número de 1×10^8 parasitos.

A quantidade de parasitos foi determinada realizando-se a contagem em câmara de Neubauer e após a extração de DNA da massa de epimastigotas, foi construída a curva padrão. Após eluição do pellet de DNA extraído em 100 mL de água ultra pura autoclavada, a concentração final foi de 10^6 parasitos/mL, considerando a extração aproximadamente 100 % eficiente. A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, *Thermo Scientific*, EUA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm, e posteriormente foram realizadas diluições seriadas de 10x, com obtenção de sete pontos, de 10^6 a 1 parasito, utilizados na curva. A curva padrão foi utilizada como referência e acrescentada a todas as placas em triplicata.

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp[®] Optical 96 - Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems by Life Technologies*, EUA), seladas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (*Applied Biosystems by Life Technologies*, EUA) em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*, EUA). Foram utilizados apenas os resultados das reações nas quais a curva padrão teve eficiência entre 90 – 100 % e obteve valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95 - 0,999$).

As amostras da curva padrão foram consideradas controles positivos e os poços nos quais foi adicionada água livre de nucleases (sem adição de DNA) foram considerados os controles negativos bem como as amostras do grupo CNI que foram submetidas à reação com os iniciadores específicos do *T. cruzi* para controle de reação inespecífica.

Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; os quais amplificam um fragmento de 182 pb do parasito (Cumming e Tarleton, 2003). As reações foram realizadas em duplicata, sendo utilizados 10 ng de DNA genômico, cinco μ L de *SYBR Green PCR Mastermix* (*Applied Biosystems*), dois μ L dos iniciadores e água livre de nucleases em quantidade suficiente para totalizar um volume final de 10 μ L por poço. Simultaneamente, na mesma placa, foi realizada a amplificação do gene GAPDH. Este foi utilizado para verificar a integridade do DNA analisado, uma vez que é expresso de forma constitutiva no modelo animal avaliado.

Para a amplificação do gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), serão utilizados os pares de iniciadores: 5' TTCCACGGCACAGTCAAG 3' e reverso:

5' ACTCAGCACCAGCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). Durante as reações, as amostras inicialmente foram submetidas à processo de desnaturação à 95 °C por 10 minutos, e em seguida por 40 ciclos à 95 °C por 15 segundos e 63 °C por 1 minuto.

A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear utilizando os valores do Ct das amostras da curva padrão, sendo consideradas negativas as amostras com Ct acima do último ponto da curva. Os resultados foram expressos pelo número de parasitos/mL de sangue.

6 - RESULTADOS

6.1 - Protocolo experimental

Considerando que a presente tese é parte dos experimentos do delineamento do estudo completo (Figuras 3 e 4), fez-se necessário descrever os resultados do protocolo experimental como um todo para melhor compreensão e adequabilidade dos dados obtidos.

Para garantir a higidez dos cães, antes de iniciar o protocolo e entre cada fase do estudo, foram realizados exames clínicos veterinários além de análises bioquímicas e hematológicas.

Os animais que compuseram as avaliações da fase aguda e crônica foram inoculados pela via intraperitoneal, 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice – 78 do *T. cruzi* para cada quilo de peso corporal do animal.

Iniciou-se com a infecção dos animais destinados ao estudo de fase crônica devido à necessidade de aguardar o período de 12 meses de evolução da doença para a posterior avaliação dos objetivos propostos. A confirmação da infecção foi realizada a partir do 10º dia de infecção por meio do exame de sangue a fresco com taxa de infectividade de 100%. A taxa de mortalidade foi de 18% no estudo completo da fase crônica (n=3, 1 Macho, 2 Fêmeas) e o óbito dos animais ocorreu com 2, 4 e 7 meses de infecção. Os demais alcançaram o período estabelecido no protocolo sendo então distribuídos em 2 grupos experimentais, sendo o Grupo I como infectado e não tratado e o Grupo II como infectado e tratado com dose múltipla de 3,5 mg de BNZ/Kg/12h

Os animais incluídos no Grupo II na fase crônica da infecção toleraram o tratamento durante o protocolo experimental sem apresentarem nenhum efeito adverso clinicamente relevante. Além disso, todos animais mostraram resultados de exames dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dentro dos limites da normalidade para as funções renal, hepática, cardíaca e muscular.

Em relação a fase aguda da doença, a confirmação da infecção foi realizada a partir do 10º dia de infecção por meio do exame de sangue a fresco com taxa de infectividade foi de 100%. A taxa de mortalidade foi nula. Os cães foram então distribuídos nos 2 grupos experimentais (Grupo I e Grupo II).

Os cães incluídos no Grupo II na fase aguda também toleraram o protocolo experimental sem apresentarem nenhum efeito adverso clinicamente relevante. Todos animais também mostraram resultados de exames dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dentro dos limites da normalidade para as funções renal, hepática, cardíaca e muscular.

O peso dos animais foi acompanhado ao longo do tratamento nos tempos 0(zero) e após 10, 40 e 60 dias de administração do BNZ não sendo observadas diferenças significativas entre grupo Grupo I e Grupo II, em ambas as fases da doença (Figura 5).

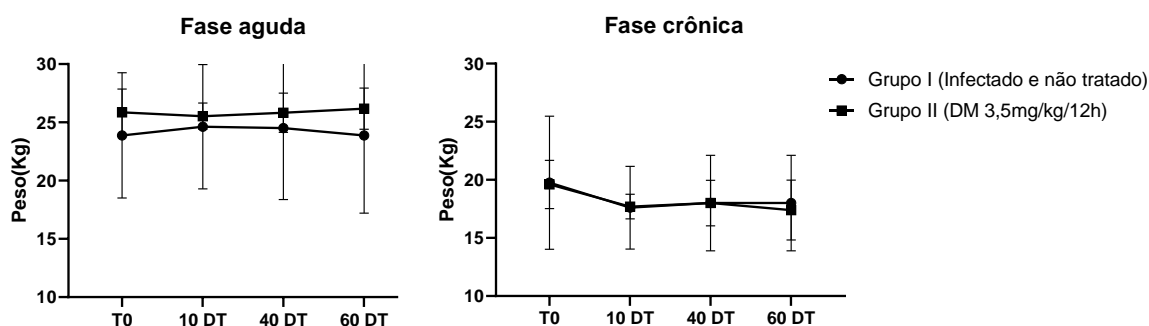


Figura 5 - Peso médio dos cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* na fase aguda e na fase crônica da doença de Chagas, tratados ou não com dose múltipla de 3,5mg de BNZ/Kg/12h/60 dias. As linhas representam as médias e as barras o IC 95%.

6.2 - Método

Análise do benznidazol em soro

O presente estudo apresenta pela primeira vez, a análise do benznidazol em soro utilizando CLAE-DAD.

Com base nas propriedades físico-químicas do BNZ e na literatura, foram realizados testes de abordagem direta com a coluna analítica C₁₈ (Phenomenex®, Gemini-NX, 150mm x 4,6mm x 5µm), no modo de fase reversa. Fases móveis com diferentes proporções da mistura água:acetonitrila foram empregadas variando-se a temperatura (30 a 45 °C) e vazão (0,7 a 1,2 mL/min). Já o detector DAD operou a 324 nm, pois neste

comprimento de onda, observou-se uma região de maior absorvidade molar e seletividade para uma solução de BNZ na concentração de 100 µg/mL.

Dentre todas as condições experimentadas com a coluna acima citada, a fase móvel constituída de mistura de água:acetonitrila (65:35, v/v) na vazão de 1 mL/min, temperatura de 40 °C e tempo de corrida cromatográfica de 5 minutos, foi a eleita para o estudo. Os cromatogramas obtidos das análises do BNZ em soro estão apresentados na figura 6.

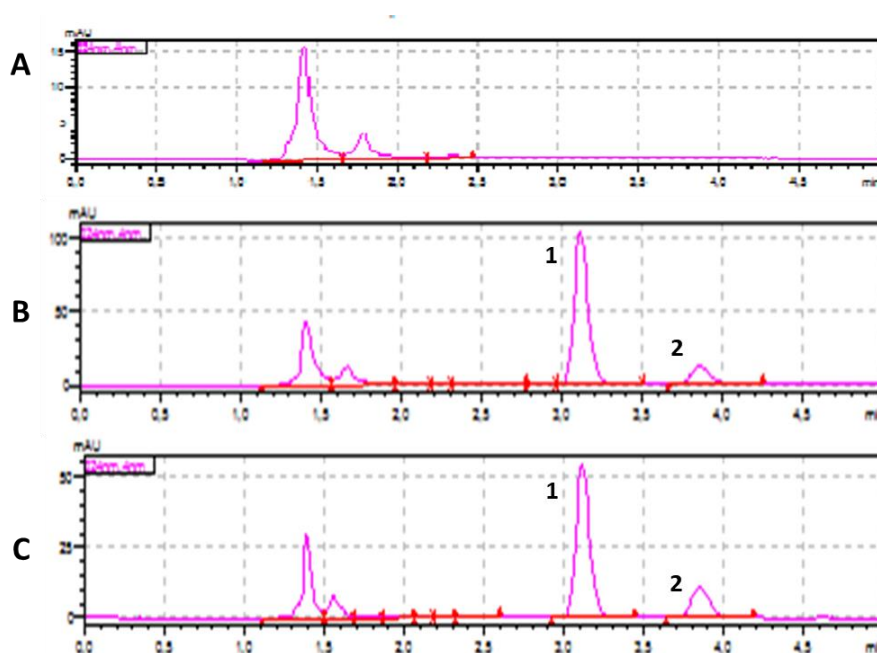


Figura 6 - Cromatogramas referentes às análises do BNZ em soro canino. (A) Soro branco; (B) Soro branco enriquecido com 5 µg de BNZ/mL; (C) Soro de cão após 6 h de administração de dose múltipla de 3,5 mg/Kg/12h de BNZ. Picos: 1- BNZ; 2- omeprazol (PI).

Validação do método de análise do benznidazol em soro

A validação da metodologia analítica desenvolvida para este trabalho foi realizada de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) e os resultados obtidos na validação do método de análise do BNZ em soro estão apresentados na Tabela 1.

O método não apresenta efeito matriz e os coeficientes de variação entre todos os FMNs foram inferiores a 15% (Tabela 1).

As curvas de calibração construídas empregando as razões de áreas *versus* concentração apresentaram linearidade em um intervalo de 0,1-100 µg de BNZ /mL de soro com coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 (Tabela 1).

Os coeficientes de variação e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de precisão e exatidão intra e intercorridas em soro (Tabela 1) foram inferiores a 15%.

Os valores da recuperação do método de extração do BNZ (extração líquido-líquido) com acetonitrila foram de aproximadamente 90% para o BNZ. Não foi apresentado efeito residual de acordo com os procedimentos descritos.

Tabela 1 - Parâmetros de validação do método de análise do benznidazol em soro.

Parâmetro	BNZ
Efeito Matriz (CV%)	7,83
Linearidade (µg/mL)	0,1 – 100,00
Equação da reta	$y = 3,35643x - 0,01370$
Coefficiente de correlação linear	$r = 0,9999$
Limite de Quantificação (µg/mL)	0,1
Precisão (CV%, n=10)	7,63
Exatidão (EPR%, n=10)	0,80
Precisão Intercorridas (CV%)	
LIQ (n=5)	5,56
CQB (n=5)	4,54
CQMB (n=5)	5,25
CQMA (n=5)	8,52
CQA (n=5)	10,41
Precisão Intra-Corridas (CV%)	
LIQ (n=5)	3,14
CQB (n=5)	5,18
CQMB (n=5)	7,58
CQMA (n=5)	9,01
CQA (n=5)	9,25
Exatidão Intercorridas (EPR%)	
LIQ (n=5)	5,00
CQB (n=5)	3,47
CQMB (n=5)	6,25
CQMA (n=5)	7,77
CQA (n=5)	8,90
Exatidão Intra-corrida (EPR%)	
LIQ (n=5)	8,00
CQB (n=5)	1,00
CQMB (n=5)	7,53
CQMA (n=5)	9,05
CQA (n=5)	10,50

Coeficiente de variação (CV) [(Desvio padrão/média) x 100]; Erro Padrão Relativo (EPR) = $[(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100$. LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle da qualidade de baixa concentração; CQMA: controle da qualidade médio alto; CQMB: controle da qualidade médio baixo; CQA: controle da qualidade de alta concentração

A estabilidade do BNZ em soro foi garantida durante três ciclos de congelamento e descongelamento em dias distintos, durante 4 h em temperatura ambiente e após o processamento durante 24 h no auto-injetor a 21 °C, já que foram revelados desvios inferiores a 15 % (Tabela 2).

Tabela 2 - Estudo de estabilidade do benznidazol em soro.

Estabilidade	%Desvio
Pós 3 ciclos de congelamento e descongelamento	
CQB	0,5
CQA	8,55
Pós-processamento (24 horas)	
CQB	0,9
CQA	14,89
Curta duração (4 horas)	
CQB	0,3
CQA	12,32

% desvio= porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal ou % desvio = $[(C_{\text{experimental}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100$. CQB: controle da qualidade de baixa concentração; CQA: controle da qualidade de alta concentração

Disposição cinética do benznidazol

O método de análise do BNZ em soro foi aplicado no estudo da disposição cinética do fármaco após tratamento com dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h (Grupo II), por 60 dias, em cães SRD, nas fases aguda e crônica da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*.

Na ocasião 3, as coletas seriadas foram realizadas após 10, 30, 40 e 60 dias de tratamento (dt) com BNZ e a análise estatística realizada entre os tempos de coleta citados e, quando agrupados, entre as fases aguda e crônica.

Os parâmetros farmacocinéticos do BNZ foram obtidos a partir de um modelo não-compartimental e comparados aos resultados obtidos do estudo de Pinto e cols (2020) para cães sadios (Dados históricos ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa). As concentrações séricas investigadas foram quantificadas até o último tempo de coleta

planejado no protocolo, ou seja, 12h após administração de dose oral de 3,5 mg/Kg de BNZ.

A curva de concentração plasmática *versus* tempo (Figura 7) e os parâmetros farmacocinéticos do BNZ 10, 30, 40 e 60 dias após a administração na fase aguda (Tabela 3) e na fase crônica (Tabela 4) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi* são apresentados a seguir.

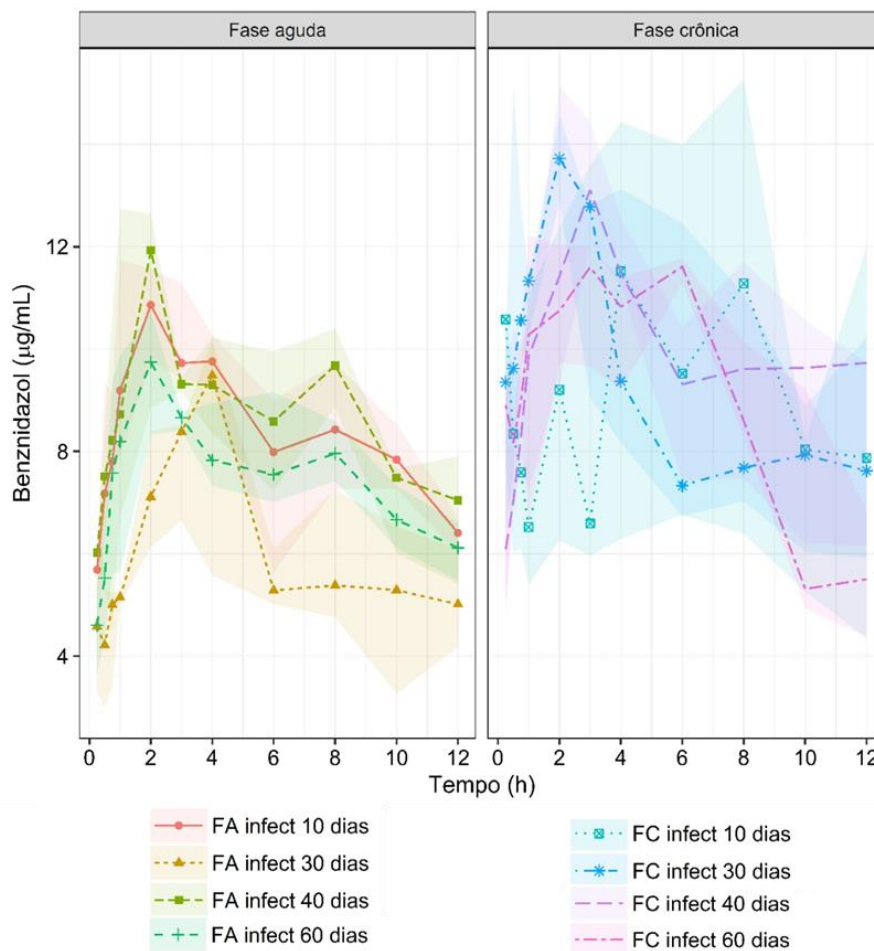


Figura 7 - Curvas de concentrações séricas versus tempo do BNZ administrado após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h em cães SRD, na fase aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. As linhas representam as medianas dos valores observados e as áreas hachuradas representam os valores de IQ 25-75 %; FA: Fase aguda; FC: Fase crônica.

Tabela 3 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h (10, 30, 40 e 60 dt) em cães SRD, na fase aguda (n=6) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).

Parâmetro (unidade)	Sadios	Fase Aguda			
		10dt	30dt	40dt	60dt
AUC₀₋₁₂ (µg.h/mL)	90.39 (79.65 – 101.13)	99.94 (79.89 – 120.98)	64.21 (55.51 – 77.75)	99.03 (88.97 – 99.57)	82.04 (77.03 – 96.52)
CL_{ss} (L/h)	0.84 (0.70 – 0.98)	0.84 (0.70 – 1.06)	1.31 (1.08 – 1.51)	0.85 (0.84 – 0.95)	1.03 (0.87 – 1.09)
V_{dss} (L)	17.34 (10.33 – 24.34)	14.53 (11.83 – 16.50)	19.21 (12.25 – 33.09)	14.75 (7.45 – 22.35)	12.24 (10.77 – 16.31)
T_{max} (h)	3.16 (2.11– 4.20)	2.5 (2.00– 3.75)	4.00 (3.25 – 4.00)	2.00 (1.25 – 3.50)	2.00 (2.00 – 2.75)
t_{1/2el} (h)	11.55 (8.66 – 17.32)	11.18 (9.71 – 12.68)	14.59 (7.56 – 17.61)	11.12 (5.61 – 18.79)	8.71 (8.16 – 10.90)
C_{max} (µg/mL)	9.70 (8.51 – 10.88)	11.48 (9.67 – 16.77)	8.10 (7.36 – 9.75)	12.35 (11.54 – 12.77)	8.97 (7.91 – 10.60)
C_{ss} (µg/mL)	7.70 (6.69 – 8.71)	8.32 (6.66 – 10.08)	5.35 (4.62 – 6.48)	8.25 (7.41 – 8.30)	6.84 (6.42 – 8.04)
C_{min} (µg/mL)	5.86 (4.80 – 6.91)	5.12 (3.79 – 5.68)	2.76 (2.50 – 3.06)	5.58 (3.60 – 5.74)	4.32 (3.45 – 4.49)
Flutuação (%)	50.95 (38.64 – 63.26)	93.23 (76.79 – 120.39)	107.75 (71.74 – 126.52)	95.06 (81.40 – 109.08)	74.86 (66.89 – 87.78)
Kel (h⁻¹)	0.06 (0.04 – 0.08)	0.06 (0.05 – 0.07)	0.05 (0.04 – 0.09)	0.08 (0.04 – 0.12)	0.08 (0.06 – 0.09)

C_{max}: concentração sérica máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC₀₋₁₂: área sob a curva concentração sérica *versus* 12h; t_{1/2el}: meia-vida de eliminação; C_{ss}: concentração no estado de equilíbrio Vd/F: volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio; CL/F: *clearance* total aparente no estado de equilíbrio; Kel: constante de velocidade de eliminação; Flutuação: diferença entre concentração plasmática máxima e mínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h.

Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado após 10, 30, 40 e 60 dias de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h (10, 30, 40 e 60 dt) em cães SRD, na fase crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).

Parâmetro (unidade)	Sadios	Fase crônica			
		10dt	30dt	40dt	60dt
AUC ₀₋₁₂ (µg.h/mL)	90.39 (79.65 – 101.13)	169.13 (83.45 – 190.10)	142.25 (125.92 – 216.83)	153.08 (126.91 – 196.43)	148.43 (125.13 – 171.60)
CL _{ss} (L/h)	0.84 (0.70 – 0.98)	0.50 (0.44 – 1.00)	0.59 (0.39 – 0.67)	0.55 (0.43 – 0.66)	0.57 (0.49 – 0.67)
V _{dss} (L)	17.34 (10.33 – 24.34)	10.80 (8.61 – 11.94)	11.84 (9.56 – 13.68)	8.02 (6.32 – 9.34)	6.02 (5.69 – 6.10)
T _{max} (h)	3.16 (2.11– 4.20)	6.00 (4.00 – 8.00)	2.00 (1.00 – 2.00)	3.00 (3.00 – 4.00)	3.00 (2.00 – 3.00)
t _{1/2el} (h)	11.55 (8.66 – 17.32)	7.98 (7.23 – 10.87)	16.06 (15.25 – 17.11)	10.66 (8.46 – 12.68)	7.91 (6.21 – 8.06)
C _{max} (µg/mL)	9.70 (8.51 – 10.88)	19.24 (10.64 – 21.38)	27.58 (18.29 – 44.82)	17.65 (17.48 – 22.00)	16.24 (14.80 – 17.65)
C _{ss} (µg/mL)	7.70 (6.69 – 8.71)	14.09 (6.95 – 15.84)	11.85 (10.49 – 18.07)	12.76 (10.58 – 16.37)	12.37 (10.43 – 14.30)
C _{min} (µg/mL)	5.86 (4.80 – 6.91)	8.34 (2.06 – 10.72)	8.97 (8.15 – 12.39)	8.10 (4.76 – 12.81)	5.84 (5.72 – 9.13)
Flutuação (%)	50.95 (38.64 – 63.26)	92.47 (92.30 – 141.44)	78.62 (70.99 – 422.96)	73.48 (73.03 – 121.86)	77.33 (59.57 – 85.06)
K _{el} (h ⁻¹)	0.06 (0.04 – 0.08)	0.09 (0.07 – 0.10)	0.043 (0.041 – 0.045)	0.07 (0.06 – 0.09)	0.09 (0.09 – 0.11)

C_{max}: concentração sérica máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC₀₋₁₂: área sob a curva concentração sérica versus 12h; t_{1/2el}: meia-vida de eliminação; C_{ss}: concentração no estado de equilíbrio V_d/F: volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio; CL/F: clearance total aparente no estado de equilíbrio; K_{el}: constante de velocidade de eliminação; Flutuação: diferença entre concentração plasmática máxima e mínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h.

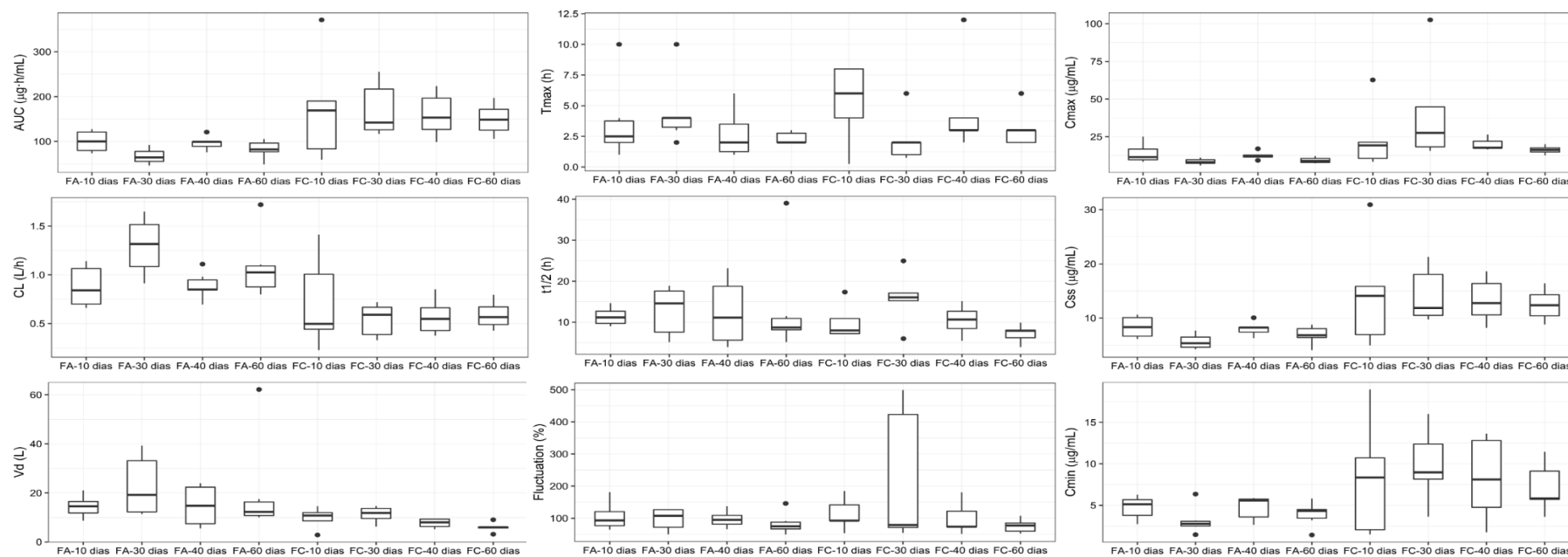


Figura 8 - Box plot da influência da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, em cães SRD, nos parâmetros farmacocinéticos do BNZ administrado após 10, 30, 40 e 60 dias em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h nas fases aguda (n=6) e crônica.

A curva de concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos referentes aos resultados agrupados por fase da infecção encontram-se, respectivamente, nas figuras 9 e 10 e na tabela 5.

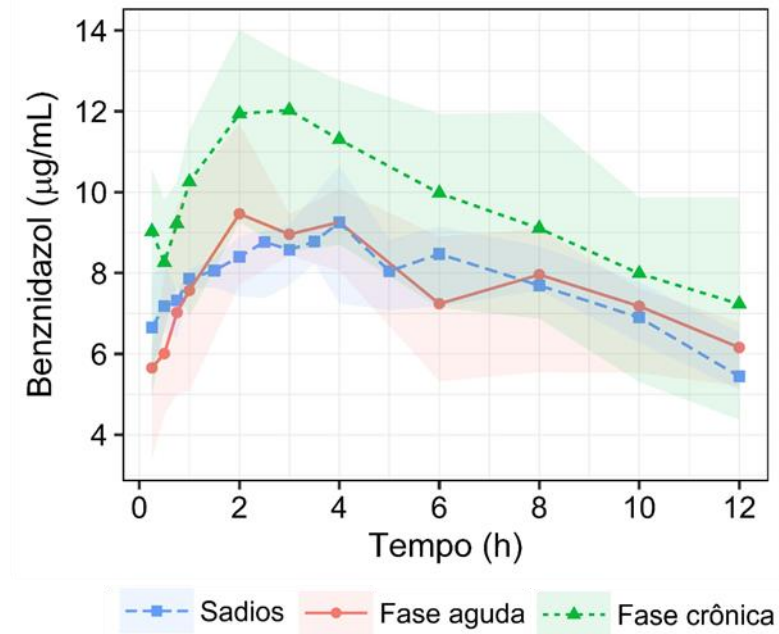


Figura 9 - Curvas de concentrações séricas versus tempo do BNZ administrado em doses múltiplas de 3,5 mg/Kg/12h via oral em cães SRD, sádios (n=8) e na fase aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. As linhas representam as medianas dos valores observados e as áreas hachuradas representam os valores de IQ 25-75 %.

Tabela 5 - Parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h, por 60 dias, em cães SRD, nas fases aguda (n=6) e crônica (n=5) da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os valores estão expressos como mediana (IQ25-75%).

Parâmetro (unidade)	Sadios	Infectados	
		Fase aguda	Fase crônica
AUC ₀₋₁₂ (µg.h/mL)	90.39 (79.65 – 101.13) #	84.98 (74.20 – 99.92) °	150.76 (123.07 – 196.56)
CL _{ss} (L/h)	0.84 (0.70 – 0.98) #	0.99 (0.84 – 1.13) °	0.56 (0.43 – 0.68)
V _{dss} (L)	17.34 (10.33 – 24.34) #	13.92 (10.80 – 20.36) °	9.20 (6.04 – 10.93)
T _{max} (h)	3.16 (2.11– 4.20)	2.50 (2.00 – 4.00)	3.00 (2.00 – 6.00)
t _{1/2el} (h)	11.55 (8.66 – 17.32)	10.30 (7.83 – 15.38)	9.09 (7.19 – 15.22)
C _{max} (µg/mL)	9.70 (8.51 – 10.88) #	10.55 (8.37 – 12.20) °	17.97 (16.08 – 23.11)
C _{ss} (µg/mL)	7.70 (6.69 – 8.71) #	7.08 (6.18 – 8.32) °	12.56 (10.26 – 16.37)
C _{min} (µg/mL)	5.86 (4.80 – 6.91)	4.32 (2.77 – 5.72) °	8.25 (4.48 – 11.68)
Flutuação (%)	50.95 (38.64 – 63.26)	90.26 (70.90 – 125.10)	81.84 (68.14 – 126.76)
K _{el} (h ⁻¹)	0.06 (0.04 – 0.08)	0.07 (0.05 – 0.09)	0.08 (0.05 – 0.10)

C_{max}: concentração sérica máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC₀₋₁₂: área sob a curva concentração sérica *versus* 12h; t_{1/2el}: meia-vida de eliminação; C_{ss}: concentração no estado de equilíbrio V_d/F: volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio; CL/F: *clearance* total aparente no estado de equilíbrio; K_{el}: constante de velocidade de eliminação; Flutuação: Diferença entre concentração plasmática máxima e mínima comparada com a concentração plasmática média em um intervalo de 12h.

p < 0,05, ANOVA: # Sadios *vs* Infectados (fase crônica); ° Infectados (fase aguda) *vs* Infectados (fase crônica)

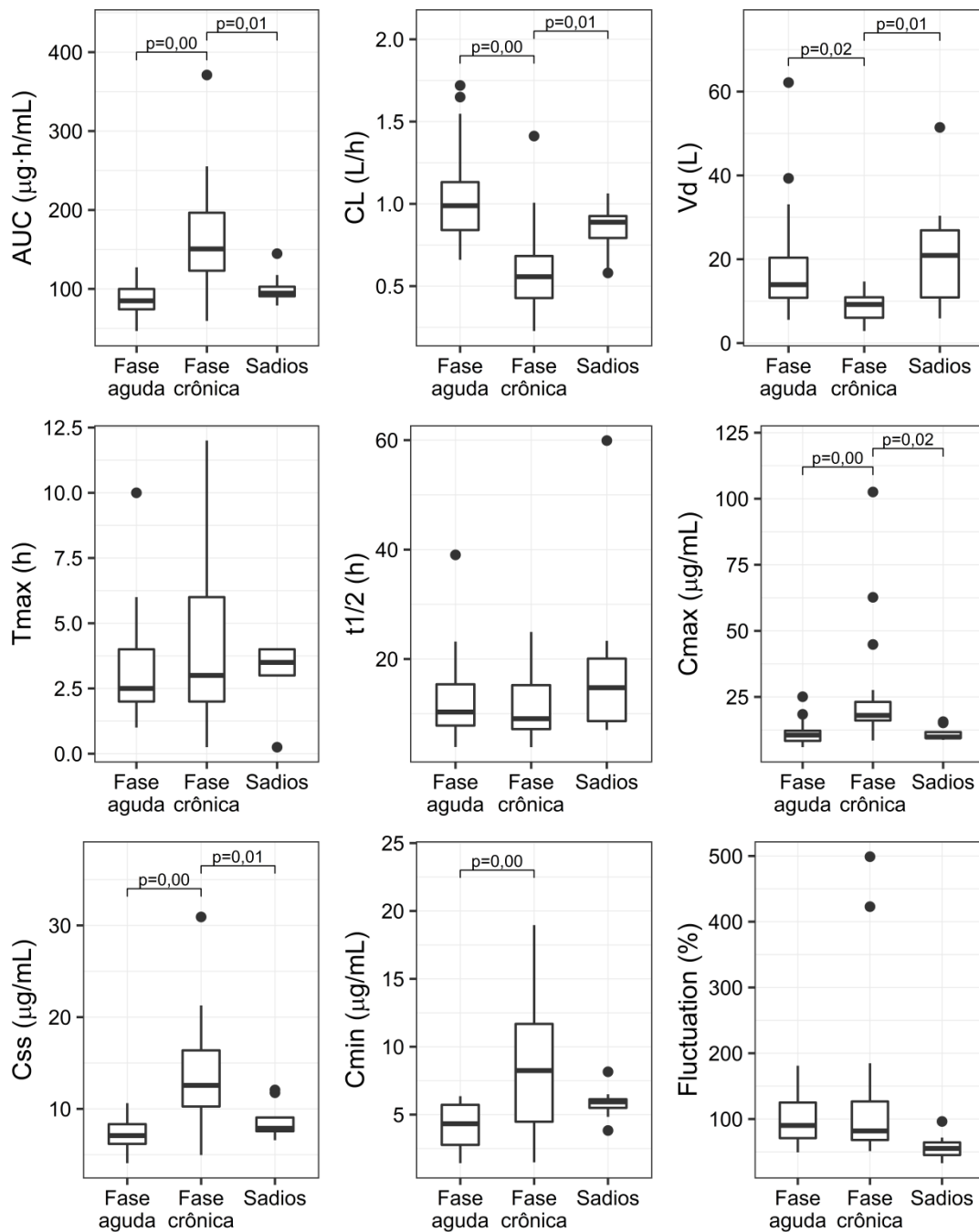


Figura 10 - Box plot da influência da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, em cães SRD, nos parâmetros farmacocinéticos do benznidazol administrado em dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h, por 60 dias, nas fases aguda (n=6) e crônica (n=5).

A disposição cinética do BNZ foi avaliada em grupos de cães infectados após administração de dose múltipla oral de 3,5 mg/Kg/12h. A análise dos resultados obtidos indica que não houve alteração dos parâmetros farmacocinéticos do BNZ durante o tratamento na fase aguda (entre os momentos de coleta seriada durante Ocasão 3), sendo o mesmo observado para o tratamento durante a fase crônica da infecção.

Entretanto, ao avaliar os dados agrupados (dados agrupados dos momentos de coleta seriada durante Ocasão 3), nota-se que a infecção crônica pela cepa Be-78 do *T. cruzi* aumenta os valores de C_{max} (9,70 vs 17,97), C_{ss} (7,70 vs 12,56) e AUC_{0-12} (90,39 vs 150,76) e, ainda, reduz V_{dss} (17,34 vs 9,20) e CL_{ss} (0,84 vs 0,56) quando comparados com os animais sadios (dados históricos do nosso grupo de pesquisa). Em relação a fase aguda, a fase crônica também eleva os valores de C_{max} (10,55 vs 17,97), C_{ss} (7,08 vs 12,56), C_{min} (4,32 vs 8,25) e AUC_{0-12} (84,98 vs 150,76) e, também, reduz V_{dss} (13,92 vs 9,20) e CL_{ss} (0,99 vs 0,56).

6.3 - Perfil de citocinas

Na Ocasão 1 (animais não infectados) e nas ocasiões 2, 3 e 4 (Grupo I e Grupo II) foram coletadas amostras de sangue para avaliação das concentrações séricas das citocinas IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6. Não foram observadas diferenças nas concentrações de citocinas liberadas na fase aguda e crônica da infecção entre as Ocasões 2, 3 e 4. Dessa forma, os dados foram agrupados e a análise estatística foi realizada comparando os Grupos I e II das fases aguda e crônica e com dados basais obtidos nos animais antes da infecção (Ocasão 1). Vale notar que a Ocasão 1 é composta por todos os animais que foram utilizados no protocolo experimental antes de serem agrupados para compor posteriormente os grupos Fase aguda e Fase crônica da infecção (n=19).

Na figura 11, é possível observar que de maneira geral as concentrações de citocinas séricas avaliadas nos cães dos Grupos I e II das fases aguda e crônica da infecção estão aumentadas em relação às concentrações séricas observadas estado basal (animais antes da infecção). O perfil geral observado para a produção de citocinas durante a fase aguda e crônica mostra que a IL-6 é produzida em maior quantidade seguida de IFN- γ , IL-10 e TNF- α , respectivamente. Esse conjunto de dados indica que a infecção pelo *T. cruzi* gera um processo inflamatório pronunciado nas diferentes fases da doença.

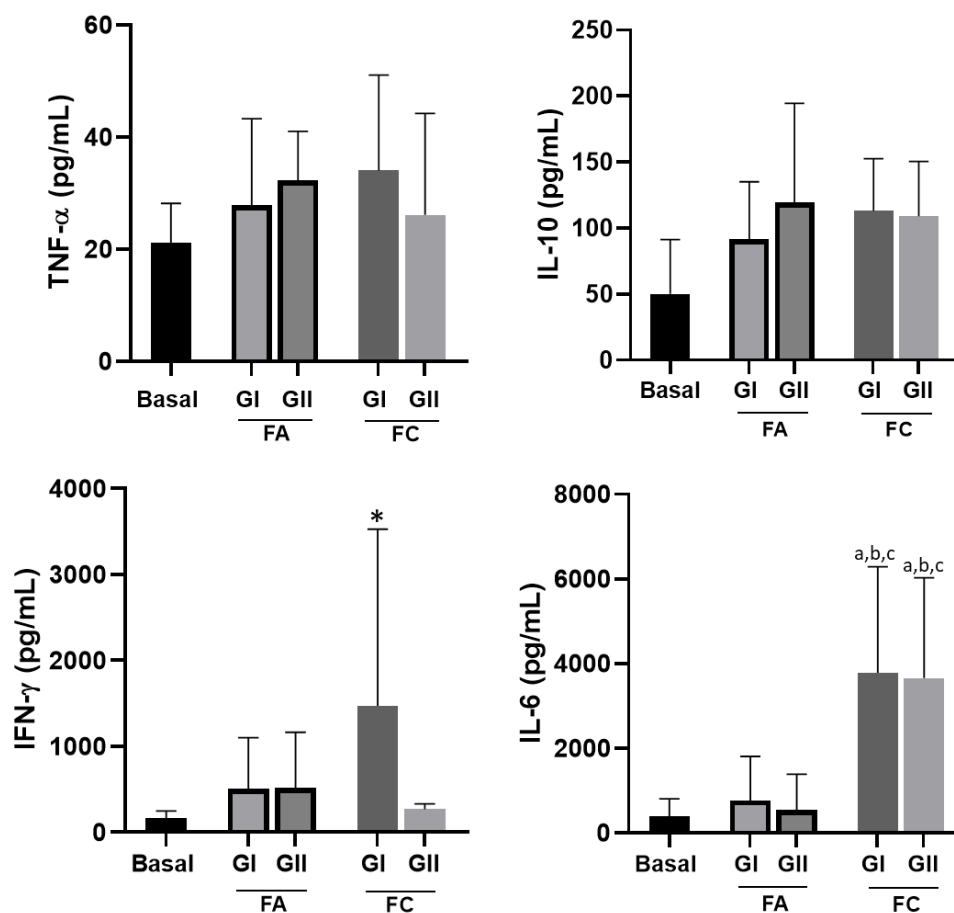


Figura 11 - Perfil das citocinas IFN- γ , IL-10, TNF- α e IL-6 em soro de cães antes (Basal) e após infecção aguda (FA) e crônica (FC) pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. GI: Grupo I (infetado e não tratado); GII: Grupo II (infetado e tratado). *GI FC vs Basal, $p < 0,05$. ^aGI ou GII FC vs Basal, $p < 0,05$. ^bGI ou GII FC vs GI FA, $p < 0,05$. ^cGI ou GII FC vs GII FA, $p < 0,05$.

Em relação ao mediador pró-inflamatório IFN- γ , sua concentração é maior nos animais que não receberam tratamento na fase crônica (Grupo I vs Basal, $p \leq 0,05$). Por outro lado, no Grupo II da fase crônica há uma redução dessa citocina a níveis quase basais sugerindo que o BNZ pode atuar modulando suas ações no processo inflamatório. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e tipicamente está aumentada independente da fase da doença sendo o mesmo observado no presente estudo (Figura 11). O TNF- α é um marcador pró-inflamatório associado ao dano cardíaco e suas concentrações séricas permaneceram similares entre as fases da doença. A IL-6 é um mediador pró-inflamatório e seu aumento está relacionado com a persistência da infecção e, interessante, somente para essa citocina, foram observadas diferenças significativas, com valores

aumentados em até 7 vezes, de suas concentrações séricas nos cães da fase crônica comparado com os cães na fase aguda da doença, mesmo quando o tratamento com o BNZ é administrado aos animais (Figura 11). Além disso, as concentrações de IL-6 estão aumentadas em até 10 vezes em relação aos valores basais obtidos quando os animais não estavam infectados (Ocasião 1).

6.4 - Carga parasitária

Nas Ocasões 2, 3 e 4 foram coletadas amostras de sangue para quantificação da carga parasitária utilizando a PCR em tempo real. Na figura 12 está representada a avaliação da carga parasitária no sangue dos animais infectados e submetidos (Grupo II) ou não (Grupo I) ao tratamento com BNZ no 10° (Ocasião 2), 70° (Ocasião 3), 100° (Ocasião 4) dias após a infecção aguda (DAI) e no 300° (Ocasião 2), 360° (Ocasião 3), 390° (Ocasião 4) DAI crônica. Nos Grupos I e II da fase aguda é observada uma elevada carga parasitária no 10° DAI que é reduzida significativamente no 70° e 100° DAI. Em relação aos Grupos I e II da fase crônica observa-se uma baixa carga parasitária no 300° e no 360° DAI, e um aumento significativo da carga parasitária do 360° para o 390° DAI, sugerindo um processo de reagudização da doença com menor tendência para o grupo II.

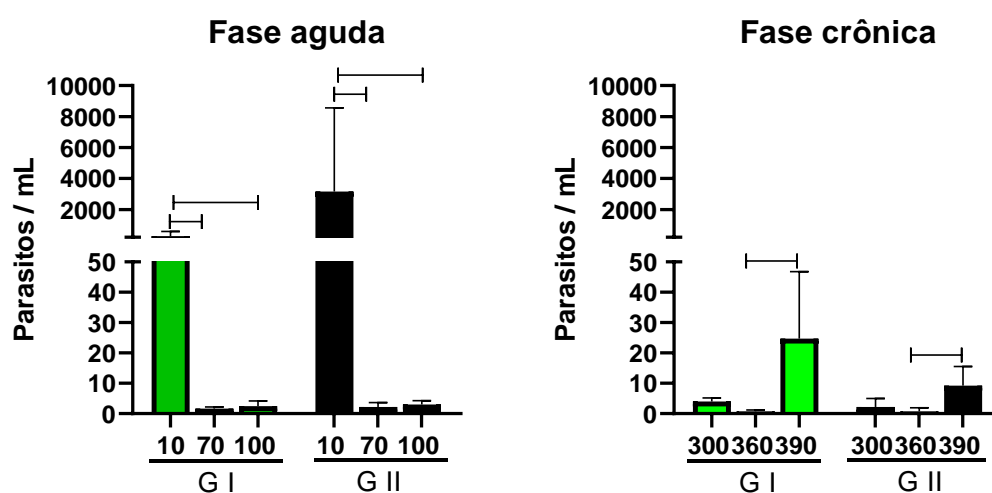


Figura 12 - Avaliação da carga parasitária no sangue dos cães SRD infectados experimentalmente pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, pertencentes aos grupos: controle infectado e não tratado (G I) e infectado e tratado com Benznidazol (G II). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelos traços.

7 - Discussão

O desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para a determinação do BNZ em matrizes biológicas é essencial para a obtenção das informações farmacocinéticas que buscamos neste trabalho.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, ponto de destaque em estudos, que envolvem análise de fármacos. Isso ocorre devido à facilidade do método em efetuar separação, identificação e quantificação das espécies químicas, podendo ainda ter seu potencial analítico aumentado haja vista a possibilidade de associação à outras técnicas instrumentais como a espectrofotometria ou espectrometria de massas.

Vários métodos bioanalíticos que utilizam técnicas cromatográficas foram propostos para determinar as concentrações de BNZ em diversas matrizes biológicas como urina, leite e plasma humano (MARSÓN *et al.*, 2013; GUERRERO *et al.*, 2010). Esses métodos foram desenvolvidos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que opera com fase móvel líquida sob pressão e com mecanismos de detecção sensíveis, possibilitando análises de rapidez comparável àquela obtida em cromatografia gasosa e fornecendo resultados altamente satisfatórios.

Na literatura, vários são os estudos *in vivo* que utilizaram a CLAE na quantificação de BNZ no plasma com o intuito de avaliar a farmacocinética desse medicamento, diferindo entre eles nas composições de fase móvel, volume de amostra, tempo de corrida, linearidade, sensibilidade, volume de injeção e entre outros fatores (WHITE *et al.*, 1982; WORKMAN *et al.*, 1984; MORILLA *et al.*, 2003; GUERRERO *et al.*, 2010; MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; LEONARDI *et al.*, 2013; MARSÓN *et al.*, 2013; PADRÓ *et al.*, 2013; PINAZO *et al.*, 2013; DAVANÇO *et al.*, 2015; PERÍN *et al.*, 2017). Entretanto, não foram encontradas evidências do uso do detector de arraste de iodo para análise das concentrações deste fármaco em soro canino, o que faz deste trabalho uma ferramenta inovadora frente aos métodos bioanalíticos preconizados anteriormente.

Com base nas propriedades estruturais do BNZ, na literatura e nas colunas analíticas disponíveis no Laboratório de Imunopatologia, onde está sendo desenvolvida esta pesquisa, foram realizados testes de abordagem direta.

A coluna C₁₈ apresentou melhor desempenho cromatográfico devido a sílica modificada com o grupamento octadecyl na qual o BNZ, sendo hidrofóbico, tende a ficar mais retido no modo escolhido, o de fase reversa. A escolha desta coluna neste trabalho corrobora com dados da literatura, pois a mesma tem se tornado escolha para análise do BNZ utilizando CLAE sendo observadas diferenças apenas nas especificações de comprimento e diâmetro da fase estacionária: 250 x 4,6mm (LEONARDI *et al.*, 2013; PADRÓ *et al.*, 2013), 250 x 4 mm (MORILLA *et al.*, 2003; GUERRERO *et al.*, 2010), 150 x 4,6mm (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012) e 100 x 4,6 mm (MARSÓN *et al.*, 2013)

Em relação ao parâmetro temperatura, o seu aumento comparado à temperatura ambiente frequentemente melhora o desempenho da coluna, porque diminui a viscosidade da fase móvel reduzindo o tempo de corrida. Tal fato é requerido em experimentos de farmacocinética visto que um massivo número de amostras é coletado para análise.

Levando-se em conta que os fatores responsáveis pela alteração do tempo de retenção de um composto são composição da fase móvel, afinidade do analito pela fase estacionária e tipo de eluição empregada, diferentes proporções entre os solventes podem ser utilizadas a fim de obterem-se resolução aceitável, picos simétricos e curto tempo de análise. A fase móvel, utilizada em análises para quantificação do BNZ, pode ser composta por uma mistura de acetonitrila:água para análise de soro de camundongos na proporção de 30:70, v/v (PERIN *et al.*, 2017), para quantificação em soro canino e em plasma de ratos na proporção 35:65, v/v (DAVANÇO *et al.*, 2015). O metanol também já foi utilizado juntamente com a água numa relação de 55 ou 66% methanol/água em matrizes biológicas de camundongos, ovelhas e cães (WORKMAN, 1984).

A vazão de 1mL/min, para o modo de eluição isocrático, foi escolhida visto que a técnica utilizada apresentou um bom *clean-up* no preparo de amostras. Além disso, a análise envolvia apenas um analito e um padrão interno, permitindo assim que a força cromatográfica da fase móvel permanecesse constante durante toda a separação.

O tempo de retenção do BNZ, observado neste estudo, foi próximo ao obtido por Morilla e cols. (2003 e 2005) sendo de 4,7 e 4,8 min. Atribui-se este tempo ao fluxo, às proporções de ACN e à água na fase móvel além das dimensões da coluna utilizada.

O efeito matriz deve ser avaliado cuidadosamente quando amostras biológicas são utilizadas e a ausência de tal efeito neste trabalho indicam que os componentes dos soros

analisados não causam nenhuma alteração do tipo supressão ou aumento do sinal no sistema CLAE-DAD. Logo, as concentrações séricas observadas não sofreram nenhuma influência da matriz utilizada no estudo visto que todos os coeficientes de variação FMNs foram inferiores a 15% (Tabela 2). Assim, a seleção das condições de preparo de amostra na análise do BNZ em materiais biológicos é uma tarefa difícil e a otimização de preparo de amostra merece atenção especial levando em consideração a natureza do analito (MARTINEZ *et al.*, 2015)

As curvas de calibração construídas (razões de áreas *versus* concentração) abrangem um intervalo linear de 0,1-100 µg de BNZ/mL de soro com correlações superiores a 0,99, atendendo todas as concentrações experimentadas. O método, empregando CLAE-DAD, mostra sensibilidade compatível com as exigências dos nossos estudos de farmacocinética.

Em relação ao limite de quantificação observado no estudo (0,1 µg/mL), é importante destacar que é o menor quando comparado aos demais. Apenas Davanço e cols (2015) apresentaram um valor próximo (0,156 µg/mL) utilizando uma metodologia de UHPLC-UV com vazão de 0,55mL/min e tempo de análise de 2 minutos. Logo, a metodologia aqui apresentada é a mais sensível dentre todos os métodos de quantificação para o BNZ encontrados na literatura.

O método desenvolvido e validado, com ausência de efeitos matriz e residual, apresenta limites de quantificação, estabilidade, precisão e exatidão compatíveis para a análise do BNZ em soro canino e foi aplicado nos estudos de farmacocinética do presente trabalho.

O BNZ é o fármaco de primeira escolha em todo o mundo para o tratamento da DCh (WHO, FDA). No entanto, apresenta frequentes e intensas reações adversas e alta variabilidade na eficácia terapêutica, em especial, na fase crônica da doença (SALES JUNIOR *et al.*, 2017). Alguns autores relacionam tais aspectos a uma baixa solubilidade e absorção oral limitada e/ou variável e, neste sentido, estudos de permeabilidade considerando apenas o coeficiente de partição permitiram classificar o BNZ como classe 3 (alta solubilidade e baixa permeabilidade) ou classe 4 (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). (DEL MORAL SANCHEZ *et al.*, 2018); (MAXIMINIANO, 2010).

O SCB corresponde a um dos grandes avanços na área de Biofarmacotécnica e baseia-se nas propriedades fundamentais que governam a absorção de fármacos, principalmente permeabilidade e solubilidade (AMIDON *et al.*, 1995). Seu principal objetivo é estimar o desempenho farmacocinético *in vivo* de um medicamento a partir de dados de permeabilidade e de solubilidade/dissolução (KARALIS *et al.*, 2008).

É importante destacar que nos estudos de classificação citados anteriormente não foram realizados testes complementares para análise de permeabilidade do BNZ, como por exemplo estudos *in vitro* com células Caco-2 e/ou estudos *in vivo* comparando rota oral. Entretanto, muitos pesquisadores em tecnologia farmacêutica buscaram desenvolver novas formulações orais de benznidazol que supõem melhorar a absorção intestinal e, conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade e o efeito terapêutico (ARRÚA *et al.* 2019; FONSECA-BERZA *et al.*, 2015; FERNANDEZ *et al.*, 2016; GARCÍA *et al.*, 2018; BARRERA *et al.*, 2020; LEONARDI *et al.*, 2009; SALOMON, 2012)

Pinto e cols (2020) (dados históricos do nosso grupo de pesquisa), analisando o perfil das concentrações séricas do BNZ e os parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração intravenosa, intraperitoneal e oral de dose única de 3,5 mg/kg, em cães saudáveis, demonstrou que a biodisponibilidade de benznidazol (F) é 1 ou 100%. O estudo, então propõe a classificação para este fármaco segundo SCB como Classe 2, ou seja, baixa solubilidade e alta permeabilidade, fato que muda as perspectivas para o desenvolvimento de novas formulações visto que deverão ser considerados outros processos farmacocinéticos que não seja a absorção.

Os modelos animais têm desempenhado um papel crítico na exploração e caracterização da fisiopatologia de doenças, na identificação de alvos e na avaliação *in vivo* de novos agentes e tratamentos terapêuticos. Propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD) são parâmetros adicionais que devem fazer parte de qualquer desenho de estudo utilizando um modelo animal. A integração de ambos os parâmetros deve idealmente levar a um bom entendimento das relações PK / PD para um determinado medicamento, melhorando assim o valor translacional do modelo animal (CHATELAIN & SCANDALE, 2020).

Para a doença de Chagas, já é bem estabelecido que o modelo cão traduz aspectos fisiopatológicos da infecção pelo *T. cruzi* e farmacodinâmicos do tratamento com BNZ, semelhantes ao observado em humanos (DE LANA, CHIARI, TAFURI, 1992; SANTOS

et al., 2012; GUEDES *et al.*, 2002; DE LANA & GIUNCHETTI, 2021) sendo, portanto, um modelo fundamental em estudos pré-clínicos. Neste estudo, foi proposto pela primeira vez avaliar a influência da infecção, aguda e crônica, sobre os parâmetros farmacocinéticos do BNZ.

A infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi* não altera a velocidade de absorção do fármaco visto que o T_{max} , tempo no qual a C_{max} é atingida, foi mantido quando comparado aos cães saudáveis. Destaca-se ainda que a absorção no modelo cão é lenta (~ 3h), sendo semelhante ao observado em humanos considerando a mesma via de administração e dose (MOLINA *et al.*, 2017; WIENS *et al.*, 2016).

Após a administração oral, a extensão da absorção é determinada pela eliminação pré-sistêmica tanto no intestino quanto no fígado, e a infecção crônica experimental interfere nesse processo visto que aumenta os valores de AUC_{0-12} (90,39 vs 150,76), C_{ss} (7,70 vs 12,56) e C_{max} (9,70 vs 17,97) quando comparados com cães saudáveis. Os mesmos parâmetros também são elevados quando se compara com a fase aguda AUC_{0-12} (84,98 vs 150,76), C_{ss} (7,08 vs 12,56), C_{max} (10,55 vs 17,97) e C_{min} (4,32 vs 8,25). Esses resultados indicam que a fase crônica aumenta a absorção do BNZ.

Alterações mediadas por doenças podem modificar a permeabilidade das barreiras intestinais. O BNZ é considerado de baixa permeabilidade e um substrato da proteína de efluxo P-gP (UPRETI, WAHLSTROM, 2016; MECCA, BARTEL, CASTRO, 2013); MOLINA *et al.*, 2017; EMA, 2011; FDA, 2020). Logo, é pertinente hipotetizar que as modificações observadas na absorção nos animais infectados e tratados na fase crônica podem estar relacionadas com a inibição dessa proteína, fato que já foi observado em várias doenças inflamatórias e infecciosas (SOLDIN, CHUNG, MATTISON, 2011; AUSTIN, MATHER, PHILPOT, MCDONALD, 1980).

Tal correlação poderá ser confirmada nos estudos futuros por meio da quantificação da fexofenadina, fármaco substrato marcador da P-gP.

Após ser administrado e absorvido, o fármaco é então transportado pelo sangue e outros fluidos a todos os tecidos do corpo sendo então distribuído. O volume de distribuição (V_d) do BNZ em cães saudáveis é considerado baixo (~17 L) corroborando com baixo V_d observado em humanos (MOLINA *et al.*, 2017; WIENS, KANTERS, MILLS *et al.*, 2016). A análise desse parâmetro na fase crônica da infecção experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi* indica uma redução do V_{dss} (17,34 vs 9,20 L) quando comparados

aos cães sadios, fato que também é observado em relação aos dados obtidos de animais na fase aguda (13,92 vs 9,20 L).

Baseado em nossos resultados e naqueles que, também reportaram baixa distribuição tecidual em camundongos *Swiss* sadios e infectados pelo *T. cruzi* (de JESUS *et al.*, 2021; PERIN *et al.*, 2020), sugere-se que a distribuição do BNZ seja limitada pela permeabilidade e que esta seja dependente da atividade dos transportadores de membrana. Logo, uma abordagem racional para o desenvolvimento de novas formulações contendo BNZ devem considerar estratégias para melhorar a distribuição tecidual deste fármaco.

O clearance (CL) (ou depuração) é uma denominação utilizada para o processo de remoção irreversível de determinada substância de um volume específico de sangue por unidade de tempo (por exemplo, L/h).

O CL é um dos parâmetros mais importantes no estabelecimento de um regime terapêutico, pois por meio dele é possível prever a dose necessária para manter as concentrações plasmáticas do fármaco em níveis terapêuticos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004). Ele é diretamente proporcional ao volume aparente de distribuição. Esta relação foi mantida em nosso estudo visto que a redução dos valores de Vd foi acompanhada da redução dos valores de CLss (0,84 vs 0,56 L/h) quando comparados os cães sadios e infectados (fase crônica). Tal fato também foi observado quando comparados os dados obtidos de animais infectados na fase aguda e na fase crônica (0,99 vs 0,56 L/h).

Os resultados obtidos indicam que a infecção crônica experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi* altera os parâmetros farmacocinéticos do BNZ, aumentando a absorção do BNZ além de diminuir o volume de distribuição e clearance no modelo cão. Sendo assim, uma possível mudança no regime de dose na farmacoterapia clínica para pacientes cronicamente infectados poderia ser necessária.

Nesse contexto, o uso de ferramentas farmacométricas são importantes para validar o cão como modelo padrão para prever a farmacocinética do benznidazol em humanos.

De acordo com Soy *e cols* (2015) e o FDA, a farmacocinética do benznidazol poderia ser diferente entre pacientes crônicos da doença de Chagas e indivíduos saudáveis, assim, um modelo animal adequado deve demonstrar essa diferença a fim de

gerar dados de previsibilidade para traduzir para humanos (CHATELAIN & KONAR 2015; CHATELAIN & SCANDALE, 2020).

Entretanto, ao contrário de nossos resultados, um estudo realizado em camundongos BALB/C infectados pela cepa CL Brener do *T. cruzi* e tratados com dose de 100 mg/Kg de BNZ demonstrou que a fase crônica da infecção não altera os parâmetros farmacocinéticos desse fármaco (FRANCISCO *et al.*, 2016). O observado pode ser atribuído à diferente cepa utilizada no estudo, bem como à espécie de camundongos e o tempo de infecção crônica. Vale lembrar que nosso grupo tem demonstrado o impacto da infecção crônica na disposição cinética do BNZ em camundongos *Swiss* infectados pela cepa Be-78 (de JESUS *et al.*, 2021), a mesma utilizada no presente estudo.

Destaca-se assim a complexidade da doença de Chagas uma vez que as interações entre a genética e fisiologia do hospedeiro com a genética do parasito determinam o resultado da infecção e a resposta ao tratamento.

Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, por meio de um *scale up* de modelos experimentais (camundongos e cães), têm demonstrado concordância de resultados quando se utiliza a cepa Be-78 *T. cruzi*. Logo, o camundongo *Swiss* e o cão SRD podem ser modelos apropriados para avaliar o impacto da infecção crônica na farmacocinética, sendo de grande valor translacional para melhor compreensão da farmacoterapia na doença de Chagas.

A constatação de que a infecção crônica experimental altera a farmacocinética do BNZ no presente estudo poderia explicar em parte a falha terapêutica na fase crônica da DCh, sendo necessário compreender o papel do processo inflamatório causado pela infecção nas alterações farmacocinéticas observadas.

No presente trabalho foi proposta uma análise da resposta inflamatória nas diferentes fases da doença, por meio da dosagem sérica das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10. Isso porque, apesar dos mecanismos moleculares das lesões serem discutidos, a presença de um ambiente inflamatório é uma característica comum às alterações observadas no tecido cardíaco e/ou digestivo (N. CORTES-SERRA *et al.*, 2020). Ademais, pacientes com DCh exibem concentrações alteradas de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4, IL-10 e IL-6, sendo que estas desempenham um importante papel na

patogênese e progressão da fase aguda e crônica da doença (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005); (AYALA *et al.*, 2016).

As citocinas IL-6, IFN- γ e TNF- α estão relacionadas com a progressão da doença exercendo um papel pró-inflamatório e a citocina IL-10 atua na contenção do processo inflamatório relacionando-se com a proteção do hospedeiro. Sendo assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias devido a ativação de mecanismos inatos, é importante para controlar a parasitemia. Mas, este cenário de inflamação exacerbada gera dano tecidual e a atuação da IL-10 é considerada importante por se tratar de uma citocina imunomoduladora produzida por linfócitos T e monócitos. (DUTRA *et al.*, 2014)

A análise do perfil das citocinas na infecção experimental do modelo cão pela cepa Be-78 do *T. cruzi* indica que durante as fases aguda e crônica há um aumento das citocinas IL-6, IFN- γ , IL-10 e TNF- α , em relação ao basal nos animais antes da infecção. Este dado coincide com os resultados observados em um estudo de Sousa e cols (2014) envolvendo amostras de plasma de 176 pessoas infectadas por *T. cruzi* e 24 indivíduos saudáveis. Neste estudo foi demonstrado que a expressão de citocinas inflamatórias plasmáticas, como IFN- γ , TNF- α e IL-6, foi maior naqueles com forma cardíaca da doença (SOUSA *et al.*, 2014). Como a cepa utilizada no protocolo experimental foi a Be-78, justifica-se o observado, pois esta cepa apresenta predomínio de formas largas e tropismo para células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas, denominada miotrópica.

Estudos anteriores indicam que além de sua atividade tripanocida o BNZ também afeta a síntese de marcadores biológicos envolvidos na inflamação (LAMBERTUCCI *et al.*, 2017). Entretanto, nossos resultados indicam que não houve alteração das concentrações séricas das citocinas IL-10 e TNF- α quando feita a comparação entre os animais infectados e não tratados e aqueles tratados com dose múltipla oral de 3,5 mg BNZ/Kg/12h durante as fases aguda e crônica da infecção. O TNF- α é um marcador inflamatório considerado preditor de mortalidade (Tsutamoto *et al.*, 2012) e geralmente está aumentado na fase crônica em relação a fase aguda da doença, principalmente em infecções por cepas de maior tropismo para o cardiomiócito (ex., Be-78). No entanto, devido ao tempo de cronificação recente dos animais utilizados no estudo (1 ano) suas concentrações não apresentaram diferenças significativas. Já a IL-10, é produzida por monócitos e está envolvida no reparo tecidual (WONG *et al.*, 2012) e tipicamente está aumentada independente da fase da doença, situação também observada no presente estudo.

Ainda sobre a relação imunomodulação/tratamento, alguns estudos têm descrito que, um dos fatores que podem potencialmente influenciar a eficácia do tratamento da DCh, é a possível ação cooperativa entre os efeitos dos fármacos e a resposta imunológica do hospedeiro (FERNANDEZ; GONZALEZ CAPP; SOLANA, 2010). Em nosso trabalho, houve uma redução na produção de IFN- γ a níveis quase basais quando os animais foram tratados durante a fase crônica da infecção, sugerindo que o BNZ pode ter atuado de maneira cooperativa com o sistema imune sendo capaz de modificar a resposta inflamatória durante fase crônica da infecção.

É sabido que as concentrações séricas de IL-6, um mediador pró-inflamatório, variam de ~1 a 10 pg/mL em indivíduos saudáveis, mas podem ser aumentadas para entre ~10 a 1.500 pg/mL em populações de pacientes com inflamação, como artrite reumatoide (AR), ou após trauma cirúrgico, infecções e transplante de órgãos (SAKAMOTO *et al.*, 1994). Nossos resultados mostraram que a IL-6 foi a citocina produzida em maior quantidade e a única com aumento significativo (em até 7 vezes) de suas concentrações séricas nos cães da fase crônica em relação à fase aguda, mesmo quando o tratamento com o BNZ é administrado. Vale notar que o fenômeno de inibição de enzimas e proteínas relacionadas com a disposição cinética de fármacos está diretamente relacionada com um aumento significativo da concentração sérica de citocinas, especialmente a IL-6 (LANCHOTE *et al.*, 2015; MACHAVARAM *et al.*, 2013). Lanchote e cols (2015) propuseram que concentrações maiores que 50 pg/mL de IL-6 seriam necessárias para um *downregulation* de CYP3A e CYP2C19 em pacientes com leishmaniose visceral. Mais recentemente, foi demonstrado que baixas concentrações de IL-6 em grupo de pacientes chagásicos (1,5 – 5,1 pg/mL) não foram suficientes para causar um *downregulation* na UGT e, então impactar a farmacocinética do nebivolol e seus metabólitos (VIEIRA *et al.*, 2020). Neste contexto, é pertinente relacionar as elevadas concentrações séricas médias de IL-6 observadas na fase crônica (> 3.000 pg/mL) com as alterações dos parâmetros farmacocinéticos do BNZ no modelo cão. Interessantemente, as concentrações séricas médias de até ~ 770 pg/mL nos cães da fase aguda da doença não foram capazes de alterar a disposição cinética do BNZ.

A maior produção de IL-6 nas fases aguda e crônica pode estar associada aos aspectos patológicos da doença. É sabido que a infecção por *T. cruzi* em modelos animais eleva os valores de IL-6 sérica e tecidual, que é induzida durante o aumento crescente da parasitemia no período agudo da doença de Chagas (GAO & PEREIRA, 2002;

TRUYENS *et al.*, 1994). Para Saavedra e cols (1999) o principal indutor deste aumento de IL-6 na infecção pelo *T. cruzi* é a enzima transialidase produzida pelo próprio parasito. Neste sentido, é possível hipotetizar mediante análise de nossos resultados que os maiores índices de IL-6 observados para a fase crônica da doença podem estar associados a persistencia da infecção observado para esses animais, e confirmada pela carga parasitária que estava até mais aumentada 30 dias após o tratamento com BNZ.

Estudos *in silico*, *in vitro* e clínicos tem demonstrado que doenças inflamatórias e/ou infecciosas como câncer (RIVORY; SLAVIERO; CLARKE, 2002), insuficiência cardíaca (FRYE *et al.*, 2002), esclerose múltipla (DE CASTRO *et al.*, 2017), psoríase (GODOY *et al.*, 2016), malária (AKINYINKA *et al.*, 2000) e leishmaniose visceral (LANCHOTE *et al.*, 2015) podem alterar a expressão e atividade de enzimas CYP450 e da proteína transportadora de efluxo P-gP muito provavelmente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. Para a DCh essa correlação ainda não está bem estabelecida, e o presente trabalho prospectou a oportunidade de preencher essa lacuna da literatura demonstrando que a infecção crônica experimental pela cepa Be-78 do *T. cruzi* tem sim um impacto na farmacocinética do BNZ no modelo cão. Como o BNZ é considerado um substrato da proteína de efluxo P-gP (UPRETI, WAHLSTROM 2016); (MECCA, BARTEL, CASTRO, 2013); (MOLINA *et al.*, 2017); (EMA, 2011); (FDA, 2020) as alterações observadas na farmacocinética podem estar associadas a inibição desse transportador devido ao aumento pronunciado da IL-6 observado durante a fase crônica da infecção. Análises futuras da atividade da proteína transportadora P-gp por meio do seu marcador fexofenadina nas amostras já coletadas irão contribuir para a confirmação dessa hipótese.

Ademais, a IL-6 é um dos principais mediadores pró-inflamatórios implicados também na modulação de enzimas metabolizadoras de fármacos em pacientes com inflamação, infecção ou estresse cirúrgico (RIVORY, SLAVIERO & CLARKE, 2002); (FRYE *et al.*, 2002); (MAYO *et al.*, 2000); (KIM, OSTOR, & NISAR, 2012). O aumento desse marcador pró-inflamatório também está associado à supressão das atividades metabólicas de enzimas do citocromo P450, como já demonstrado, por exemplo, que em pacientes na fase aguda da leishmaniose visceral houve supressão de CYP3A4 e CYP2C19 (LANCHOTE *et al.*, 2015). Estas alterações podem modificar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de muitos dos fármacos em uso na clínica, e consequentemente alterar a eficácia e segurança terapêutica (MORGAN, 2009).

Especialmente quando se considera que os pacientes na fase crônica da doença podem desenvolver a CCC (cardiomiopatia chagásica crônica, forma mais grave da doença), apresentar insuficiência e arritmia cardíaca, e tromboembolismo e outros, necessitando assim a utilização de polifarmácia para tratamento e minimização de possíveis complicações. Logo, nossas futuras análises de coquetel de marcadores da atividade de enzimas CYP450 serão fundamentais para melhor compreensão do impacto da doença de Chagas na farmacocinética, e conseqüentemente eficácia e segurança de tais medicamentos.

A PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada na avaliação da eficácia de quimioterapias em diversos modelos experimentais. Neste trabalho, esta ferramenta foi utilizada para determinar a carga parasitária em sangue de cães infectados pelo *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com o BNZ (Figura 11), no intuito de realizar o controle de cura dos animais após quimioterapia utilizando o BNZ. Em comparação com os métodos parasitológicos e os testes sorológicos, a qPCR exibe marcada relevância diagnóstica devido à maior sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito, bem como a quantificação da carga parasitária (CALDAS *et al.*, 2019).

Os resultados indicaram que em relação ao Grupo I da fase aguda da infecção houve redução da carga parasitária do 10° para o 70° e 100 ° DAI, fato que se deve muito provavelmente devido ao tropismo tecidual da cepa Be-78 do *T. cruzi* em seu processo de cronificação, que ocorre por volta de 60° DAI. Para o Grupo II da fase aguda da infecção foi observado o mesmo comportamento do Grupo I, entretanto não é possível inferir eficácia do tratamento com o BNZ, já que o estudo se limita em não quantificar a carga parasitária antes do processo de cronificação (60°DAI), ou seja, não é possível distinguir se houve a erradicação do parasito pelo tratamento ou tropismo natural da cepa Be-78 para os tecidos. Segundo Britto e cols (2001), a PCR é mais segura e mais sensível para detectar a cura após tratamento específico, mas o resultado negativo e também uma baixa carga parasitária após o tratamento específico indicam a ausência de DNA do parasito naquele momento específico, o que não pode ser assumido como uma cura definitiva quando apenas um ponto de tempo é analisado. Além disso, a baixa carga parasitária observada nos animais na fase crônica corresponde ao que se é esperado de comportamento de tropismo tecidual do parasito, a saber os órgãos coração, cólon e cérebro são preferenciais para a cepa Be-78 do *T. cruzi*. Considerando que em 390° DAI

corresponde à Ocasão 4 – 30 dias após o fim do tratamento, pode-se sugerir que o BNZ não foi eficaz em erradicar o parasito uma vez que foi observado um aumento significativo da carga parasitária entre o 360° e 390° DAI, sugerindo uma possível “reagudização” da infecção. Portanto, a determinação da carga parasitária nos tecidos poderia contribuir para um melhor entendimento do resultado de carga parasitária observado em sangue de cães nas fases aguda e crônica da infecção, conseqüentemente relacionar com a eficácia ou não do tratamento.

8 – CONCLUSÕES

1 - O método de análise do benznidazol em soro empregando CLAE-DAD apresenta limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética em cães SRD;

2 - A infecção aguda experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* não altera os parâmetros C_{max} , T_{max} , C_{min} , AUC_{0-12} , $t_{1/2el}$, C_{ss} , V_d/F , CL/F , K_{el} e Flutuação em cães SRD;

3 - A infecção crônica experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* aumenta os valores de C_{max} , C_{ss} e AUC_{0-12} e ainda reduz V_{dss} e CL_{ss} quando comparados com cães SRD sadios;

4 - A infecção crônica experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* eleva os valores de C_{max} , C_{ss} , C_{min} e AUC_{0-12} e também reduz V_{dss} e CL_{ss} quando comparados com cães SRD na fase aguda;

5 - A infecção aguda e crônica experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* eleva os níveis séricos de mediadores do processo inflamatório, sendo a IL-6 a citocina mais pronunciada, principalmente na fase crônica da infecção;

6 - O tratamento com o benznidazol não foi capaz de promover a cura parasitológica dos cães tratados nas diferentes fases da doença de Chagas experimental.

Finalmente, conclui-se que o presente estudo é a primeira evidência científica de que a infecção crônica experimental pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* altera a farmacocinética do BNZ em cães, provavelmente pela inibição da P-gp causada pelo aumento da citocina pró-inflamatória IL-6.

9 - REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF-alpha, IFNgamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 231–244, 1996.

ACEVEDO, G. R. *et al.* The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9:1929, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01929

AKINYINKA, O. O. *et al.* The pharmacokinetics of caffeine in Nigerian children suffering from malaria and kwashiorkor. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 153-8, 2000.

ALCAIDE, P. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L-selectin. **International Immunology**, v. 16, n. 10, p. 1365–1375, 2004. doi: 10.1093/intimm/dxh138

ALONSO-PADILLA J. *et al.* Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 17, n. 3, p. 145–57, 2019.

ALTCHEH, J. *et al.* Population pharmacokinetic Study of Benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2907, 2014.

AMIDON, G. L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ANDRADE, D.V. *et al.* Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 7, p. 1–10, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003010

ANDRADE, J.P. *et al.* I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 97(2 Suppl3):1–48, 2011.

ANDRADE, Z. A. *et al.* A patologia da doença de Chagas experimental no cão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75(3-4), p. 77-95, 1980. doi: 10.1590/S0074-02761980000200008

ÃNEZ, N. *et al.* Myocardial parasite persistence in chronic Chagasic patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 726–732, 1996.

ANTÚNEZ, M. I. *et al.* IL-12 and IFN-g production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* Infections. **Immunology Letters**, v. 71, n. 2, p. 103–109, 2000. doi: 10.1016/S0165-2478(99) 00172-8

ARRÚA, E. C. *et al.* Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. **Acta Tropica**, v. 198, 2019.

AUSTIN, K. L. *et al.* Intersubject and dose-related variability after intravenous administration of erythromycin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 3, p. 273-9, 1980.

AYALA, M. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces the expression of CD40 in murine cardiomyocytes favoring CD40 ligation-dependent production of cardiopathogenic IL-6. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 779-785, 2016.

BARRERA, M. G. *et al.* A novel prototype device for microencapsulation of Benznidazole: In Vitro/In Vivo Studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 112, 2020.

BASTOS, C. J. C. *et al.*, Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.

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

BLANCO, S. B. *et al.* Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: An operational outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 4, p. 293–301, 2000.

BOCCHI, E. A. *et al.* Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 12, p. 1510-24, 2017.

BONNEY, K. M. *et al.*, Pathology and pathogenesis of Chagas heart disease. **Annual Review of Pathology**, v. 14, n. 1, p. 421-47, 2019

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo - Patologia. 10^a. ed. Editora: Guanabara Koogan, 2021.

BRENER, Z. *et al.* Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–110, 1997.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRITTO, C. *et al.* Parasite persistence in treated Chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 823–826, 2001.

CALDAS, I. S. *et al.* An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797–807, 2019.

CENTER FOR DEVICES AND RADIOLOGICAL HEALTH, **Evaluation of Sex-Specific Data in Medical Device Clinical Studies**, U.S. Food and Drug Administration, disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance->

documents/evaluation-sex-specific-data-medical-device-clinical-studies-guidance-industry-and-food-and-drug>, acesso em: 02 Junho. 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHANDRASEKAR, B. *et al.* Induction of proinflammatory cytokine expression in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 223, n. 2, p. 365–71, 1996.

CHATELAIN, E and SCANDALE, I. Animal models of Chagas disease and their translational value to drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**. 1-22. 10.1080/17460441.2020.1806233, 2020.

CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug design, development and therapy**, v. 19, n. 9, p. 4807-23, 2015.

CHEVILLARD, C. *et al.* Disease tolerance and pathogen resistance genes may underlie *Trypanosoma cruzi* persistence and differential progression to Chagas disease cardiomyopathy. **Frontiers Immunology**, v. 9, 2791, 2018.

CHIPPAUX, J. P. *et al.* Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 87–93, 2010.

CORTES-SERRA, N. *et al.* State-of-the-art in host-derived biomarkers of Chagas disease prognosis and early evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* treatment response. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1866, n. 7, 2020. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165758

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 31-40, 2009.

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

CUNHA-NETO, E. *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 252–258, 2009. doi: 10.1590/S0074-02762009000900032

DATASUS, disponível em:
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/Chagasbr.def>>, acesso em 18 de Julho de 2022.

DAVANÇO, M.G. *et al.* Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 7, p. 1008-1015, 2015.

DAVANÇO, M. G. *et al.* Benznidazole Extended-Release tablets for improved treatment of chagas disease: Preclinical pharmacokinetic study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2492-98, 2016.

DE CASTRO, F. A. *et al.* Enantioselectivity in the metabolism of cyclophosphamide in patients with multiple or systemic sclerosis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 784-795, 2017.

DE LAMA, M. *et al.* Dogs as a model for chemotherapy of Chagas disease and Leishmaniasis. **Current pharmaceutical design**, v. 27, n. 14, p. 1741-1756, 2021. doi: 10.2174/1381612826666201228142703

DE LANA, M. *et al.* Experimental Chagas' disease in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 59–71, 1992.

DE LANA, M. Experimental studies of Chagas disease in animal models. Telleria J and Tibayrenc M (Org). **American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research**. 2ed. Oxford: Ed. ELSEVIER 2017; p. 299-314, 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-801029-7.00014-9

DE LANA, M. *et al.* Revisiting the posttherapeutic cure criterion in Chagas disease: Time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts? **Biomed Research International**, v. 2015:652985, 2015.

DEL MORAL SANCHEZ, J.M. *et al.* Biopharmaceutical optimization in neglected diseases for paediatric patients by applying the provisional paediatric biopharmaceutical classification system. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 2231-41, 2018.

DIAS, J. C. P. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs: historical perspective. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 193-202, 2015.

DÍAZ, P. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 2099–2108, 2015. doi: 10.1128/IAI.00031-15.

DICKMANN, L. J. *et al.* Effects of Interleukin-6 (IL-6) and an Anti-IL-6 Monoclonal Antibody on Drug-Metabolizing Enzymes in Human Hepatocyte Culture. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 8, p. 1415-22, 2011.

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

DOSREIS, G. A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Today**, v. 13, n. 9, p. 335–342, 1997.

DOYLE, P. S. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **PLoS Pathogens**, v. 7, n.9, p. 1–11, 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.1002139

DUTRA, W. O. *et al.* Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 377-87, 2014. doi: 10.1111/pim.12107

DUTRA, W. O. *et al.* The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 581-7, 2005.

Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi. Doença de Chagas: tratamentos atuais. 2019. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/tratamentos-atuais/>>. Acesso em 27 de Agosto de 2022.

ECHEVERRIA, L.E. *et al.* American Trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.

EMA. 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation. (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009). London, UK: EMA.

EMA, **Bioanalytical method validation - European Medicines Agency**, European Medicines Agency, disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>>, acesso em: Maio. 2020.

FABBRO, D. L. *et al.* Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

FDA. Evaluation of Sex-Specific Data in Medical Device Clinical Studies. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. Available at <https://www.fda.gov/media/82005/download>. Accessed 21 May 2020.

FDA. 2017. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s) of benznidazole. Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/209570Orig1s000ClinPharmR.pdf> Acesso em: Janeiro, 2020.

FERNANDEZ, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 2, p. 172-180, 2010.

FERNÁNDEZ, M. L. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic responses in adult patients with Chagas disease treated with a new formulation of benznidazole. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 218-221, 2016.

FERREIRA, L. R. P. *et al.* Interferon-g and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 8, p. 782–790, 2014. doi: 10.4330/wjc.v6.i8.782

FERREIRA, R. C. *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/”indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407–411, 2003.

FONSECA-BERZAL, C. *et al.* Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 84–91, 2015.

FONSECA, L. M. *et al.* Theft and reception of host cell’s sialic acid: dynamics of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases and mucinlike molecules on Chagas’ disease immunomodulation. **Frontiers Immunology**, v. 10 164, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00164

FRANCISCO, A. F. *et al.* Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

FRYE, R. F. *et al.* Plasma levels of TNF- α and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 8, n. 5, p. 315-9, 2002.

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Carlos Chagas. 2019. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=109&sid=7>. Acesso em: 27 de Agosto de 2019.

GAO, W. *et al.* Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology** , v. 32, n. 2, p. 167-70, 2002.

GARCÍA, M. C. *et al.* Preclinical pharmacokinetics of benznidazole-loaded interpolyelectrolyte complex-based delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 122, p. 281-91, 2018.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L- arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v. 22, n.10, p. 2501-2506, 1992.

GODOY, A. L. *et al.* Pharmacokinetics of venlafaxine enantiomers and their metabolites in psoriasis patients. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 567-75, 2015.

GOMES, J. A. S. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1-Specific Immune Response. **Infect Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003. doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003

GUEDES, P. M. M. *et al.* Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, n. 5, p. 609-20, 2011. doi: 10.1586/eri.11.31

GUEDES, P. M. M. *et al.* The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Tropica**, v. 84, n. 1, p. 9–17, 2002.

GUERRERO, L *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, Issue 1, p. 77–82, Nov 2010.

HOWLAND, RD; MYCEK, M. J. *Farmacologia Ilustrada*. 3^a. ed. Editora: Artmed, 2007.

HYLAND, K. V. *et al.* Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3641-50, 2007.

KARALIS, V. *et al.* Bioavailability and bioequivalence: focus on physiological factors and variability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1956-62, 2008.

KEENAN, M. *et al.* A new era for Chagas disease drug Discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 185-230, 2015.

KIM, S. *et al.* Interleukin-6 and cytochrome-P450, reason for concern? **Rheumatology international**, v. 32, n. 9. p. 2601-2604, 2012.

KRAUTZ, G.M. *et al.* The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 1, p. 31–34, 2000.

LAFEPE, BENZNIDAZOL. Responsável técnico: Leduar Guedes de Lima. Recife: LAFEPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, 2013. Bula de Remédio.

LAMAS, M. C. *et al.* Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International journal of pharmaceuticals**, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

LAMBERTUCCI, F. *et al.* Benznidazole, the trypanocidal drug used for Chagas disease, induces hepatic NRF2 activation and attenuates the inflammatory response in a murine model of sepsis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 315, p. 12–22, 2017.

LANCHOTE, V. L. *et al.* Impact of visceral leishmaniasis and curative chemotherapy on cytochrome P450 activity in brazilian patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 1160-8, 2015.

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

LEONARDI, D. *et al.* Effects of benznidazole:cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 543-8, 2013.

LIDANI, K.C.F. *et al.* The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers Microbiology**, v. 8, 607, 2017.

LIZETTE, E. R. *et al.* Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 200, 105168,ISSN 0001- 706X, 2019.

doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105168

Losada Galván, I.; Alonso-Padilla, J.; Cortés-Serra, N.; Alonso-Vega, C.; Gascón, J.; Pinazo, MJ Benznidazol para o tratamento da doença de Chagas. **Especialista Rev. Anti. Infectar. Ter.** 2020 , 1-10.

MACHADO, F. S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012. doi: 10.1007/s00281- 012-0351-7

MACHAVARAM, K. K. *et al.* A physiologically based pharmacokinetic modeling approach to predict disease-drug interactions: suppression of CYP3A by IL-6. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 2, p. 260-8, 2013.

MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9(7)e0003816, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003816

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 483- 485, 2010.

MANSOLDO, F. R. P. *et al.* Chagas Disease: perspectives on the past and present and challenges in drug discovery. **Molecules (Basel Switzerland)**, v. 25(22), 5483, 2020. doi: 10.3390/molecules25225483

MARSÓN, M. E. *et al.* Development of UV/HPLC methods for quantitative analysis of benznidazole in human plasma and urine for application in pediatric clinical studies. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, n. 5, p. 384-90, 2013.

MATEUS, J. *et al.* An animal model of acute and chronic Chagas disease with the reticulotropic Y strain of *Trypanosoma cruzi* that depicts the multifunctionality and dysfunctionality of T cells. **Frontiers Immunology**, 10, 918, 2019.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: the role of coronary microvascular derangements. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n. 5, p. 536–541, 2013. doi: 10.1590/ 0037-8682-0028-2013

MARSHALL, J. S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, 2018.

MARTINDALE. **The complete drug reference**. London: UK: Royal Pharmaceutical Society, 2005.

MARTINEZ, N. *et al.* Development of a LC-MS/MS methodology for the monitoring of the antichagasic drug benznidazole in human urine. **Talanta**.Jan;131:656-60. doi: 10.1016/j.talanta.2014.08.040,2015

MARTINS, G.A. *et al.* Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunology Letters**, v. 63, n. 2, p. 113–120, 1998.

MATSUDA, N.M. *et al.* The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, 2009.

MAXIMIANO, F. P. *et al.* Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1714-19, 2010.

MAYA, J.D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–20, 2007.

MAYO, P. R. *et al.* Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. **Br. J. Clin. Pharmacol.** v. 50, n. 6, p. 605-613, 2000.

MECCA, M. M de. *et al.* Effect of chronic alcohol drinking on rat liver microsomal nitroreductive metabolism of Nifurtimox and Benznidazole. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, n. 12, p. 1305–1310, 2013.

MILLS, R. M. Chagas disease: epidemiology and barrier to treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 11, p. 1262–1265, 2020. doi: 10.1016/j.amjmed.2020.05.022

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61(4):e01912–16, 2017.

MOREIRA DA SILVA, R. *et al.* Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3344-48, 2012.

MORILLO, C.A. *et al.* Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. **New England Journal Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MORGAN, Edward. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, n. 4, p. 434-8, 2009.

MORILLA, M. J. *et al.* Liposomal benznidazole: a high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. **Journal of chromatographic science**, v. 41, n. 8, p. 405-9, 2003.

MORILLA, M. J.; PRIETO, M. J.; ROMERO, E. L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 213-9, 2005.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: The STOP-CHAGAS trial. **J Am Col Cardiol.** v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MURTA S. M. *et al.* In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 10, p. 535–44, 1999.

NOGUEIRA, S. S. *et al.* Challenges of immunosuppressive and antitrypanosomal drug therapy after heart transplantation in patients with chronic Chagas disease: A systematic review of clinical recommendations. **Transplantation Reviews**, v. 32, n. 3, p. 157–167, 2018.

OPAS/OMS Brasil - Nova publicação da OPAS mostra progressos e desafios na eliminação de 11 doenças infecciosas negligenciadas nas Américas | OPAS/OMS, Pan American Health Organization / World Health Organization, disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5262:nova-publicacao-da-opas-mostra-progressos-e-desafios-na-eliminacao-de-11-doencas-infecciosas-negligenciadas-nas-americas&Itemid=812>, acesso em: Julho. 2020.

Organização Pan-Americana da Saúde. Doenças infecciosas negligenciadas nas Américas: histórias de sucesso e inovação para alcançar os mais necessitados. Organização Pan-Americana da Saúde (2016).

PADRÓ, J. M. *et al.* Development of an ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma, **Talanta**, V.107, p 95-102, 2013

PATTERSON, S. *et al.* Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–98, 2014.

PERDOMO, V. G. *et al.* Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by Benznidazole in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4894–4902, 2013.

PÉREZ-ANTÓN, E. *et al.* Impact of benznidazole treatment on the functional response of *Trypanosoma cruzi* antigen-specific CD4+CD8+ T cells in chronic Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis**. 12:e0006480. doi: 10.1371/journal.pntd.0006480, 2018.

PÉREZ-MOLINA, J.A. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

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

PERIN, L. *et al.* Population pharmacokinetics and biodistribution of benznidazole in mice, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 8, p. 2213-21, 2020.

PIAGGIO, E. *et al.* Trypanocidal drug benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF-kappaB activation. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3422–3426, 2001.

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. 390-395, 2013.

PINTO, L. R. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in experimental chronic Chagas disease using the Swiss mouse-Berenice-78 *Trypanosoma cruzi* strain model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

QIDWAI, T. *et al.* Impact of genetic variations in C-C chemokine receptors and ligands on infectious diseases. **Human Immunology**, v. 77, n. 10, p. 961–971, 2016. doi: 10.1016/j.humimm.2016.06.010.

RAAFLAUB, J. *et al.* Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-forschung**, v. 29, n. 10, p. 1611-1614, 1979.

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-forschung**, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980.

RASSI, A.Jr. *et al.* Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the benznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

RASSI, A. Jr. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

REED, S.G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **The Journal of Immunology**, v. 140, n.12, p. 4342-4347, 1988.

RIVORY, L. P. *et al.* Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. **British journal of cancer**, v. 87, n. 3, p. 277-280, 2002.

RODRIGUES, M. M. *et al.* The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development, **Journal of Parasitology Research**, v. 2012:507874, 2012. doi: 10.1155/2012/507874.

SANTOS, E. S. *et al.* Tolerogenic dendritic cells reduce cardiac inflammation and fibrosis in chronic Chagas disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 488, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.00488

ROMANHA, A. J. *et al.* Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 823–828, 2002.

RUSSOMANDO, G. *et al.* Treatment of congenital chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 487–491, 1998.

SAAVEDRA, E. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates interleukin 6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of experimental medicine** , v. 190, n. 12, p. 1825-36, 1999.

SAKAMOTO, K. *et al.* Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. **Cytokine**, v. 6, n. 2, p. 181-186, 1994.

SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-303, 2017.

SALOMON, Claudio J. First century of chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-94, 2012.

SANTOS, F. M. *et al.* Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 161, p. 44–54, 2016.

SANTOS, F. M. *et al.* Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1987-95, 2012.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 441–449, 2003.

SERRÁN, M. G. *et al.* Unconventional pro-inflammatory CD4+ T cell response in B celldeficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers Immunology**, v. 8, 1548, 2017.

SILVA, J.S. *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169-174, 1992.

SILVEIRA, C. A. *et al.* 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. 191–196, 2000.

SOLARI, A. S. *et al.* Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. **J Antimicrob Chemother**. v. 48, n. 4, p. 515–519, 2001.

SOLDIN, O. P.; CHUNG, S. H.; MATTISON, D. R. Sex Differences in Drug Disposition. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–14, 2011.

SOSA-ESTANI, S. *et al.* Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 484–487, 2009.

SOUSA, G. R. *et al.* Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS One**, v. 6;9(3):e87082, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087082

SOY, D. *et al.*, Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3342–49, 2015.

STAROBINAS, N. *et al.* Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? **Research in Immunology**, v. 142, n. 2, p. 117-122, 1991.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

TARLETON, R. L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 73, n. 2, p. 186-190, 1988.

TEIXEIRA, A. R. L; *et al.* Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82(974), p. 788–798, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011. doi: 10.1128/CMR.00063-10

TOUTAIN, P. L. *et al.* Plasma clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 415–425, 2004.

TROCHINE, A. Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Negl Trop Dis**. 8(5):e2844. doi: 10.1371/journal.pntd .000284, 2014

TRUYENS, C. *et al.* Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. **Infection and immunity**, v. 62, n. 2, p. 692-6, 1994.

TSUTAMOTO, T. *et al.* Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. **J Am Coll Cardiol**. v. 31, n. 2, p. 391–8, 1998. doi: 10.1016/S0735-1097(97)00494-4

UPRETI, V. V. *et al.* Meta-analysis of hepatic cytochrome P450 ontogeny to underwrite the prediction of pediatric pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetic modeling. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 266-83, 2016.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.

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

VIEIRA, C.P., NEVES, D.V., NARDOTTO, G.H.B. *et al.* Chronic Chagas disease with low plasma concentrations of IL-6 does not have a major impact on nebivolol glucuronidation. **Eur J Clin Pharmacol** v. 76, 735–737 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00228-020-02837-9>

VIOTTI, R. *et al.* Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 151-62, 1994.

VIOTTI, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 2, p. 157-63, 2009.

WALTON, M. I. *et al.* Nitroimidazole bioreductive metabolism: Quantitation and characterisation of mouse tissue benznidazole nitroreductases in vivo and in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 6, p. 887-896, 1987.

WHITE, R. *et al.* The pharmacokinetics in mice and dogs of nitroimidazole radiosensitizers and chemosensitizers more lipophilic than misonidazole. **International Journal of Radiation Oncology BiologyPhysics**, v. 8, n. 3-4, p. 473-6, 1982.

WIENS, M. O. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the pharmacokinetics of benznidazole in the treatment of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7035-42, 2016.

WILKINSON, S. R. *et al.* Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets, **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, 2009.

WONG, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic research**, v. 53, n. 1, p. 41– 57, 2012. doi: 10.1007/s12026-012-8297-3

World Health Organization. Health Topics. Available online: <http://www.who.int/topics/en/> accessed on 11 November 2022.

Health topics, Who.int, disponível em: <<https://www.who.int/health-topics>>, acesso em: 15 de Janeiro. 2020.

WORKMAN, P. *et al.* Preclinical pharmacokinetics of benznidazole, **British Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 291–303, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, Who.int, disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>, acesso em: Maio. 2020.

Anexo I

Certificado Comitê de Ética CEUA/UFOP


**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1366 Fax: (31) 3559-1370
Email: comet@ceua.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2017/38, intitulado "Influência da doença de Chagas na atividade das enzimas do sistema citocromo P450, das proteínas de transporte e na farmacocinética e biodistribuição do benznidazol no modelo cão.", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a) *Claudia Martins Carneiro*, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Cão / SRD	18	04-10 meses	Macho	CCA/UFOP
Cão / SRD	18	04-10 meses	Fêmea	CCA/UFOP

Restrição de dieta: (X) sim () não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 01/02/2019

Ouro Preto, 6 de setembro de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

