

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

**ANA LIA MAZZETI**

**Benznidazol em combinação com alopurinol:  
aumento da atividade anti- *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo***

**OURO PRETO**

**2014**

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

**Benznidazol em combinação com alopurinol:  
aumento da atividade anti- *Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo**

**AUTOR: Ana Lia Mazzeti**

**ORIENTADORA: Maria Terezinha Bahia**

**CO-ORIENTADORA: Livia de Figueiredo Diniz**

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

**OURO PRETO**

**2014**

M477b      Mazzeti, Ana Lia.  
Benznidazol em combinação com alopurinol [manuscrito]:  
aumento da atividade anti-Trypanosoma cruzi in vitro e in  
vivo / Ana Lia Mazzeti. - 2014.  
67f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia.  
Coorientador: Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz.

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

1. Chagas, Doença de. 2. Trypanosoma cruzi. 3.  
Tripanossomose - Tratamento. I. Bahia, Maria Terezinha. II.  
Diniz, Livia de Figueiredo. III. Universidade Federal de  
Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



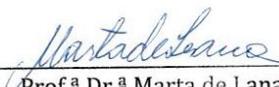
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**

**“Benznidazol em combinação com alopurinol: aumento da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo”**

Aos dezessete dias do mês de março de 2014, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Ana Lia Mazzeti**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... *aprovar* ..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Terezinha Bahia  
Presidente (UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta de Lana  
Examinadora (UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Pinto  
Examinador (UEM)

**DATA DA DEFESA: 17/03/2014**



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

*Aos meus pais, Marina e Luiz, pelo apoio incondicional. A minha família pelo companheirismo. Ao Carlos pelo amor e companhia. A todos do LADOC pelo aprendizado.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e pela proteção.

À minha família por ser meu alicerce e meu porto seguro. Aos meus pais, Luís e Marina, por me apoiar em tudo na minha vida e por darem meios para que eu pudesse conseguir o que quero. Aos meus irmãos, Júlio e Juliana por serem meus companheiros. Meus tios, tias e primas pela constante presença e incentivo. Vô e vó, pelo exemplo, orações e, principalmente, pelo amor.

A todos meus amigos de Guaranésia e Ouro Preto por tornarem minha jornada mais divertida.

A República Patotinha, moradoras, ex-alunas e D. Linda, por me proporcionarem um lar nesta cidade.

Ao Carlos por todo amor, companheirismo, compreensão, ajuda, enfim por tudo, simplesmente essencial em minha vida.

A todos os colegas do Laboratório Doença de Chagas, alunos de iniciação, mestrados e doutorandos pela ajuda e pelo conhecimento compartilhado.

Aos colegas de mestrado pelo convívio e ajuda essenciais na minha caminhada.

A Lívia e Lud pela ajuda e pelos conhecimentos partilhados, imprescindíveis para minha formação.

À professora Terezinha pela orientação e suporte para que eu pudesse executar este trabalho com qualidade.

À UFOP, Capes, DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) e Fapemig pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 1  |
| 1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas .....   | 2  |
| 1.1. Quimioterapia para a doença de Chagas .....  | 4  |
| 1.2. Os inibidores da via de salvação de purinas .....  | 7  |
| 1.4 A terapia de combinação de fármacos no tratamento da infecção por <i>T.cruzi</i> ..   | 9  |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....   | 11 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 13 |
| 3.1. Objetivo geral .....   | 14 |
| 3.2. Objetivos específicos .....  | 14 |
| <b>4. METODOLOGIA</b> .....   | 15 |
| 4.1. Parasito .....   | 16 |
| 4.2. Fármacos .....   | 16 |
| 4.3. Experimentos <i>in vitro</i> .....   | 16 |
| 4.3.1. Cultivos de células H9c2.....  | 16 |
| 4.3.2. Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular.....   | 17 |
| 4.3.3. Ensaio de citotoxicidade .....   | 17 |
| 4.3.4. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos fármacos benznidazol e alopurinol sobre formas amastigotas: definição da IC-50..... | 18 |
| 4.3.5. Avaliação da interação de benznidazol e alopurinol sobre formas amastigotas .....  | 19 |
| 4.3.6. Análise estatística – experimentos <i>in vitro</i> .....   | 20 |
| 4.4. Experimentos <i>in vivo</i> .....  | 20 |
| 4.4.1. Modelo Animal.....   | 20 |

---

|  |            |
|--|------------|
| 4.4.2. Infecção e esquema de tratamento .....  | 21         |
| 4.4.3. Avaliação da eficácia do tratamento.....  | 21         |
| 4.4.4. Exame de sangue fresco .....  | 23         |
| 4.4.5. Extração do DNA e realização da PCR de sangue periférico.....   | 23         |
| 4.4.6. Mortalidade.....  | 24         |
| 4.4.7. Avaliação Sorológica.....   | 24         |
| 4.4.8. Análise estatística dos experimentos <i>in vivo</i> .....   | 25         |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....   | <b>26</b>  |
| 5.1. Resultados <i>in vitro</i> .....  | 27         |
| 5.1.1. Determinação da citotoxicidade dos compostos avaliados e de suas combinações para células de mamíferos .....              | 27         |
| 5.1.2. Avaliação da atividade anti- <i>T.cruzi</i> alopurinol e benznidazol utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y ..... | 28         |
| 5.2. Resultados <i>in vivo</i> .....   | 34         |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....  | <b>44</b>  |
| <b>7. CONCLUSÃO</b> .....  | <b>533</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>555</b> |

## RESUMO

O tratamento da doença de Chagas apresenta limitações relacionadas à sua eficácia variável, particularmente na fase crônica, e aos efeitos adversos frequentes, que podem levar à interrupção do tratamento. A terapia de combinação de fármaco parece ser uma estratégia ideal, já que pode contribuir para o aumento da eficácia do tratamento, diminuição da toxicidade e da probabilidade de desenvolvimento de resistência. No presente estudo foi avaliada a atividade do alopurinol (Al) em combinação com o benznidazol (Bz) na infecção experimental por *T. cruzi*. Inicialmente, foi verificada a atividade da combinação Bz/Al sobre a infecção de células H9c2 infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*, incubando-as com diferentes concentrações de cada composto isoladamente ou em combinação. Foi utilizado, *in vitro*, o método de diluição “tabuleiro de dama” (checkerboard) e os resultados foram analisados utilizando índice de combinação (CI) calculado pelo software *Calculusyn*. A avaliação global dos resultados demonstrou que os CI variaram no intervalo de 0,62 a 1,76, o que sugeriu um efeito aditivo resultante da associação *in vitro* dos compostos avaliados. Posteriormente, foi realizada a avaliação *in vivo* da combinação Bz/Al. Para isso, camundongos Swiss fêmeas foram inoculados com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. O tratamento foi administrado por via oral durante 20 dias consecutivos, iniciado quatro dias após a inoculação. Os animais foram tratados com Bz (100, 75, 50 e 25 mg/kg) ou Al (90, 60 e 30 mg/kg) isoladamente ou em combinação (Bz/Al: 75/90 75/60 75/30, 50/90 , 50/60, 50/30, 25/90 , 25/60 e 25/30 mg/kg ). Os seguintes parâmetros foram utilizados para determinação da cura parasitológica: exame de sangue a fresco durante e até 60 dias após o tratamento e ensaio de PCR em tempo real de amostras de sangue (30 e 180 dias após o tratamento). A análise dos níveis de parasitemia após o tratamento com Bz mostrou um efeito tripanocida dose-dependente. Entretanto, mesmo havendo uma redução significativa do nível de parasitemia após o tratamento, a cura parasitológica foi identificada apenas nos animais tratados com 75 e 100mg de Bz por kg de peso corporal (20 e 70 % de cura, respectivamente). De forma diferente, não foi verificada efeito dose-dependente resultante do tratamento com Al. Além disso, não foi observada redução da parasitemia nem cura entre os animais que receberam diferentes doses desse fármaco. Posteriormente, foi avaliado o efeito das combinações entre Bz/Al, *in vivo*. O efeito benéfico das combinações dos fármacos foi demonstrado pela redução significativa da parasitemia detectada em todos os animais que receberam a terapia de

combinação. Além disso, foi observado um aumento no índice de cura entre os animais tratados com os fármacos em combinação, uma vez que a administração de Bz-75 mg/kg + Al-90 mg/kg ou Bz-75 mg/kg + Al-60 mg/kg induziu 100 % de cura, e a combinação de Bz-75 mg/kg + Al-30 mg/kg ou Bz-50 mg/kg + Al-60 mg/kg induziu, respectivamente, 80 e 20 % de cura. Em conclusão, a combinação de Bz e Al apresentou um efeito benéfico, uma vez que foi identificada cura parasitológica em uma proporção maior de animais tratados com os medicamentos em associação do que naqueles que receberam as mesmas doses de cada fármaco em monoterapia. Nossos resultados reforçam a importância da identificação de combinações de compostos já comercializados que apresentem uma interação positiva no tratamento da infecção por *T. cruzi*. Esta abordagem pode contribuir para otimizar os custos e tempo investidas na pesquisa relacionada à toxicidade e a biodisponibilidade de novas drogas para o consumo humano.

**Palavras chaves:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, terapia de combinação, Benznidazol, Alopurinol.

## ABSTRACT

Current chemotherapy for Chagas disease is unsatisfactory due to its limited and variable efficacy, particularly in chronic phase, and frequent side effects that can lead to treatment discontinuation. Combined therapy is envisioned as an ideal approach since it may improve treatment efficacy and decrease toxicity and resistance likelihood. In this work, we evaluated the activity of the alopurinol (Al) in combination with the benznidazole (Bz) upon *T. cruzi* infection. First, we investigated the activity of the Bz/Al combination on intracellular parasites of Y stain by incubating *T. cruzi*-infected H9c2 cells with different concentrations of each compound alone or in combination. *In vitro* drug interactions were assessed using a “checkerboard method” and the results were analyzed by calculating of the combination index (CI) using Calcosyn software. The overall assessment of the results demonstrated CI (0,62 a 1,76) suggesting an *in vitro* additive effect between the evaluated drug combination. Subsequently, the *in vivo* evaluation of the Bz/Al combination was performed in mice infected with 5000 blood tripomastigotes of Y stain. Treatment was administered orally for 20 consecutive days, beginning at 4 days after inoculation. Animals were treated with Bz (100, 75, 50 e 25 mg/kg) or Al (90, 60 e 30 mg/kg) alone or in combination (Bz/Al: 75/90, 75/60, 75/30, 50/90, 50/60, 50/30, 25/90, 25/60 e 25/30 mg/kg). The parameters chosen to determine parasitological cure were parasitaemia during and up to 60 days after treatment and blood real time PCR assay (30 and 180 days post treatment). First, the effects of several doses of each drug alone on the evolution of the infection in mice were evaluated. The analysis of parasitemia levels after Bz-treatment showed a dose-dependent trypanocidal effect. Although there was significant reduction in the level of parasitemia after treatment, parasitological cure was documented only in animals treated with 75 and 100 mg of Bz per kg of body weight (20 and 70 % of cure, respectively). Differently, a dose-dependent effect was not observed among treated animal and the parasitemia reduction or cure was not verified among animals that received different doses of Al. In a second series of data analyses, the activities of the combinations of the Bz/Al were compared. Here the beneficial effect of the drug combinations was demonstrated by a significant reduction of parasitemia detected in all animals that received the combination therapy. Besides increase in rate of cure among animals treated with combination therapy was observed, since the combination of the Bz-75 mg/kg + Al-90 mg/kg or Bz-75 mg/kg + Al-60 mg/kg induced 100% of cure, and the

combination of 75 mg/kg + Al-30 mg/kg or Bz-50 mg/kg + Al-60 mg/kg induced, respectively, 80 and 20% of cure. In conclusion, the combination of Bz and Al suggest a beneficial effect, as parasitological cure was observed in a higher proportion of animals treated with the drugs in association than in animals receiving the same dose of each of the drugs in monotherapy. Our results reinforce the importance of identifying already-marketed compounds with synergistic effects. This approach may help avoid expensive and time-consuming research on the toxicity and biological availability of drugs for human consumption.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, combination therapy, Allopurinol, Benznidazol.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Fórmula estrutural do benznidazol [n-benzyl-2-(2-nitro-1h-imidazol-1-yl)acetamide]..... 5
- FIGURA 2:** Fórmula estrutural do alopurinol [1,5-diidro-4h-pirazol[3,4-d]-pirimidina-4-ona] ..... 7
- FIGURA 3: Desenho esquemático do método de “tabuleiro de damas” de diluição de fármacos para testes de combinação *in vitro*.** Foram utilizadas concentrações fixas de alopurinol (500, 100 ou 10 µm) e associadas a diferentes concentrações de benznidazol (5; 2,5; 1,25 ou 0,625 µM). Al - Alopurinol, Bz- benznidazol ..... 19
- FIGURA 4: Representação cronológica do experimento utilizado para avaliação de cura.** Os camundongos foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com 25, 50, 75 e 100 mg/kg de benznidazol e 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol em monoterapia ou em combinação. Foi realizado exame de sangue a fresco antes e após a imunossupressão com ciclofosfamida e coletas de sangue para PCR e sorologia 30 e 180 dias após o fim do tratamento. (dpt: dias pós tratamento).....22
- FIGURA 5: Ensaio para avaliação da citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de alopurinol ou benznidazol isoladamente ou em combinação.** Percentual de redução da resazurina por células H9c2 incubadas por 72 horas com diferentes concentrações de alopurinol (Al), benznidazol (Bz), com combinações de alopurinol e benznidazol (Bz+Al) e com dimetilsulfóxido (DMSO). CNT – células não tratadas. A leitura da reação foi feita seis horas após a adição do corante. \* indica diferença significativa, com relação ao controle não tratado, ao nível de  $p < 0,001$ .....28
- FIGURA 6: Atividade alopurinol sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Dez mil células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença de concentrações decrescentes de alopurinol por 72 horas. Assim,

calculou-se o percentual de células infectadas após os diferentes tratamentos, bem como a inibição da infecção..... 29

**FIGURA 7: Atividade do benznidazol (Bz) e do alopurinol (Al) utilizados isoladamente sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Dez mil células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de alopurinol e benznidazol, por 72 horas. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de dois experimentos independentes. O IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando-se o *software calcsyn*..... 30

**FIGURA 8: Atividade do benznidazol e do alopurinol isoladamente ou em combinação sobre o índice endocítico de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Dez mil células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação. \* indica diferença em relação às duas drogas administradas em monoterapia ( $p < 0,01$ ). CI: Controle infectado: células infectadas não tratadas ..... 31

**FIGURA 9: Isoblograma representativo das interações *in vitro* do alopurinol e benznidazol contra amastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Os números na abcissa representam os índices de combinação do benznidazol e os na ordenada, do alopurinol, calculados a partir do índice endocítico das monoterapias e das combinações. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. .... 33

**FIGURA 10: Atividade do benznidazol e do alopurinol isoladamente ou em combinação sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Fotomicrografias representativas dos efeitos anti-*Trypanosoma cruzi* do benznidazol e alopurinol em monoterapia ou em combinação no tratamento de células H9c2 infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*..... 34

**FIGURA 11: Efeito do tratamento com diferentes doses de alopurinol nos níveis de parasitemia.** (A) Curva de parasitemia detectada no sangue periférico de 10 camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol por 20 dias consecutivos e controle sem tratamento (NT). (B) Log do

máximo da parasitemia detectada no sangue periférico desses animais. O insert representa a análise da correlação (Pearson) entre a dose administrada e a parasitemia.  
 ..... 35

**FIGURA 12: Efeito do tratamento com diferentes doses de benznidazol nos níveis de parasitemia.** (A) Curva de parasitemia detectada no sangue periférico de 10 camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com 25, 50, 75 e 100 mg/kg de benznidazol por 20 dias consecutivos e controle sem tratamento (NT). (B) Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico desses animais. o insert representa a análise da correlação (Pearson) entre a dose administrada e a parasitemia.  
 ..... 36

**FIGURA 13: Efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação na reativação natural da parasitemia.** Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico de animais (n=10) que apresentaram reativação da parasitemia até 30 dias após o tratamento (antes da imunossupressão). Os animais foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol e com diferentes combinações destes compostos. Barras brancas: monoterapia com benznidazol; barras pretas: monoterapia com alopurinol, barras listradas: terapia combinada. +: diferença significativa com monoterapia de Al; \*: diferença significativa com monoterapia com Bz. .... 41

**FIGURA 14: Efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação na reativação parasitemia após a imunossupressão.** Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico de animais (n=10) que apresentaram reativação da parasitemia após a imunossupressão com ciclofosfamida realizada 30 dias após o tratamento. Os animais foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol e com diferentes combinações destes compostos. Barras brancas: monoterapia com benznidazol; barras pretas: monoterapia com alopurinol; barras listradas: terapia combinada, +: diferença significativa com monoterapia de Al; \*: diferença significativa com monoterapia com Bz. .... 42

**FIGURA 15: Efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação na nos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi*.** Níveis de anticorpos da classe IgG detectados no soro dos animais (30 e 180 dias após o tratamento). Os animais foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol e com diferentes combinações destes compostos..... .43

**LISTA DE TABELAS**

- TABELA 1:** Efeitos anti-*Trypanosoma cruzi* do benznidazol e alopurinol em monoterapia ou em combinação no tratamento de células H9c2 infectadas pela cepa Y: % de inibição do índice endocítico em relação ao controle e índice de combinação.....32
- TABELA 2:** Percentagem de animais infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* que apresentaram supressão da parasitemia após o tratamento com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol, em monoterapia ou em combinação, e o número de doses necessárias para a indução da negatificação da parasitemia. .... 38
- TABELA 3:** Reativação da parasitemia e positividade da PCR de camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol em monoterapia ou em combinação.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |  |          |   |
|-----------------|--|----------|---|
| %               | percentagem                            | h        | Horas                                       |
| AIDS            | acquired immunodeficiency syndrome     | HGPRT    | Hipoxantina guaninafosforribosiltransferase |
| Al              | Alopurinol                             | IE       | Índice endocítico                           |
| Bz              | Benznidazol                            | IgG      | Imunoglobulina G                            |
| Cy              | Ciclofosfamida                         | Kg       | Quilograma                                  |
| CI              | combination index                      | LIT      | Liver Infusion Tryptose                     |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                     | Log      | Logarítimo                                  |
| DMEM            | Dulbecos Medium                        | μL       | Microlitro                                  |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido                       | mL       | Mililitro                                   |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico              | mg       | Miligramas                                  |
| k-DNA           | DNA do cinetoplasto                    | ng       | Nanograma                                   |
| DNDi            | Drugs for Neglected Disease Initiative | μg       | Micrograma                                  |
| DP              | Desvio padrão                          | μM       | Concentração micromolar                     |
| dpt             | Dias pós-tratamento                    | mM       | Concentração milimolar                      |
| dNTP's          | Desoxinucleotideos                     | mpk      | Miligramas por quilograma                   |
| DTU             | Discrete typing units                  | ND       | Não detectado                               |
| ELISA           | Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay      | NT       | Não tratado                                 |
| ESF             | Exame de sangue a fresco               | nm       | Nanômetros                                  |
| g               | Gramas                                 | <i>p</i> | Significância                               |
|                 |  | pb       | Pares de base                               |

|              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| PBS          | phosphate buffered saline         |
| PCR          | Reação em Cadeia Polimerase       |
| SFB          | Soro fetal bovino                 |
| RNA          | Ácido ribonucléico                |
| rpm          | Rotações por minuto               |
| TNF $\alpha$ | Fator de necrose tumoral $\alpha$ |
| WHO          | World Health Organization         |

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A tripanossomíase americana, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909, apresenta como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, cuja principal característica é a presença de uma organela denominada cinetoplasto (Chagas, 1909).

Primitivamente uma enzootia, a infecção pelo *T. cruzi* passou a constituir-se em problema de saúde pública devido à domiciliação dos insetos vetores. Em condições naturais, o parasito apresenta um complexo ciclo de vida que se alterna entre diferentes hospedeiros: vertebrados de diversas ordens e invertebrados pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros. Existem 141 espécies (Schofield & Galvão, 2009) conhecidas de triatomíneos, no entanto, somente algumas espécies pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* têm importância destacada como vetores de *T. cruzi* entre seres humanos e animais domésticos (WHO, 2002).

O ciclo no hospedeiro invertebrado inicia-se pela ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo de triatomíneos em um hospedeiro infectado por *T. cruzi*. No tubo digestivo do triatomíneo, estas formas se diferenciam em formas epimastigotas, que ao atingirem o intestino médio multiplicam-se por divisão binária. Posteriormente, estas formas migram para a porção posterior do tubo digestivo do vetor dando início ao processo de metaciclogênese do parasito originando os tripomastigotas metacíclicos (Garcia *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2009). A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre através da penetração destas formas eliminadas nas fezes e/ ou urina do triatomíneo na pele lesada ou através da penetração na mucosa íntegra do hospedeiro (Brener, 1973; Andrade & Andrews, 2005).

Após a penetração, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de invadir qualquer célula nucleada do hospedeiro e, no citoplasma destas, se diferenciam em formas amastigotas as quais se multiplicam. Após alguns ciclos de replicação, os amastigotas diferenciam em tripomastigotas que saem da célula e caem na circulação, sendo denominadas tripomastigotas sanguíneas, podendo infectar outras células ou reiniciar o ciclo de infecção, caso ingeridas por um novo inseto vetor (Brener, 1973; Andrade & Andrews, 2005).

A infecção humana por *T. cruzi* também pode ocorrer por vias alternativas como, por exemplo, por via oral através da ingestão de alimentos contaminados (Dias, 2006;

Nóbrega *et al.*, 2009), transfusões sanguíneas (Schmunis, 1999), transplantes de órgãos (Altclas *et al.*, 2005), transmissão congênita (Torrico *et al.*, 2004), acidentes de laboratório, dentre outras.

Segundo a Organização Mundial de Saúde há cerca de 7-8 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* atualmente (WHO, 2013). Com a intensa migração da população de áreas endêmicas da América Latina para áreas não endêmicas, a doença de Chagas se encontra em profunda expansão para Estados Unidos, Japão, Canadá e Austrália e países da Europa, onde hoje residem cerca de 300.000 a 400.000 indivíduos infectados (Schmunis, 2007). Estima-se que mais de 10.000 mortes anuais sejam causadas pela doença em todo o mundo (WHO, 2010).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. A fase aguda corresponde ao período inicial da infecção, caracterizado por intensa proliferação do parasito nos tecidos do hospedeiro. Esta fase persiste por cerca de dois meses e apresenta-se assintomática na maioria dos casos. Quando presentes, os principais sintomas são febre, edema, poliadenia, alterações eletrocardiográficas, hepatoesplenomegalia e perturbações neurológicas (Dias, 1992). Em crianças e pacientes imunodeprimidos, a fase aguda sintomática muitas vezes pode ser fatal, devido a casos de meningo-encefalite e, mais raramente a miocardite aguda difusa (Barret, 2003; Remme, 2006).

Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, as manifestações da fase aguda regridem e instala-se gradativamente a fase crônica da doença, na qual a parasitemia e o parasitismo podem permanecer escassos por toda a vida do indivíduo não tratado (Dias, 1992). Nesta fase, a maioria dos pacientes é assintomática, caracterizando a forma clínica indeterminada da doença, os quais podem permanecer assim indefinidamente. Entretanto, mesmo após um longo período assintomático, cerca de 25% dos indivíduos podem desenvolver a forma cardíaca, 6-9% a forma digestiva e 3% podem sofrer envolvimento do sistema nervoso periférico (Coura 1983, 1985; Pereira, 1985; Moncayo, 1999). Uma pequena porção dos indivíduos na fase crônica pode vir a desenvolver a forma mista, onde são observadas alterações cardíacas e digestivas (Rezende, 2000; Rassi *et al.*, 2010). As diferentes formas clínicas são responsáveis por elevada morbidade em adultos jovens, economicamente produtivos, sendo o acometimento cardíaco a manifestação mais grave e frequente, levando tipicamente a arritmias, fenômenos tromboembólicos, falência cardíaca e morte súbita (Chapadeiro, 1999; Nunes *et al.*, 2012).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas ainda não estão suficientemente esclarecidos. Atualmente sabe-se que o parasito é responsável por desencadear e manter a reação inflamatória relacionada à doença (Jones *et al.* 1993; Higuchi, 1993a), e esse processo de injúria pode ser amplificado por eventos autoimunes associados à genética do parasito e do hospedeiro (Leon *et al.* 2003). Considerando que as alterações imunopatológicas progridem ao longo da evolução da doença crônica e que o parasito desempenha papel essencial no desenvolvimento do dano cardíaco observado na cardiopatia chagásica (Barbosa *et al.* 1986; Higuchi *et al.* 1993a; Higuchi 1993b), o tratamento etiológico eficaz se faz absolutamente necessário.

### **1.1. Quimioterapia para a doença de Chagas**

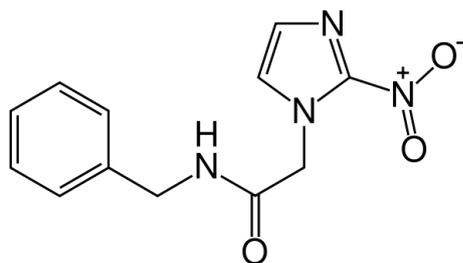
Desde sua descoberta, em 1909, várias substâncias foram testadas no intuito de se obter um tratamento eficaz para a doença de Chagas. Os primeiros compostos avaliados na quimioterapia experimental dessa enfermidade foram o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio. Porém, todos eles se mostraram ineficazes (Coura & Castro, 2002).

Até o final da década de 60, vários outros compostos foram testados, mas sem resultados promissores. Em 1967, foi introduzida na terapêutica da doença de Chagas uma classe de fármacos mais eficazes no tratamento, os nitrofuranos (Bock *et al.*, 1969). Entre estes, o nifurtimox ganhou mais destaque por ser o mais efetivo. E em 1972, o benznidazol, um derivado 2-nitroimidazólico, foi descoberto e incluído no tratamento da doença de Chagas.

Depois de quase quatro décadas o nifurtimox e benznidazol ainda são os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento humano desta enfermidade. No Brasil, a utilização do nifurtimox foi descontinuada, sendo o benznidazol atualmente produzido e distribuído pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco [LAFEPE], após os direitos de patente e tecnologia terem sido cedidos ao governo brasileiro pelo grupo suíço Roche<sup>®</sup> em 2003 (MS, 2003).

O benznidazol é um composto nitro-heterocíclico, apresentando um grupo nitro ligado ao anel imidazol, como apresentado na figura 1. Este composto funciona como pró-fármaco e deve ser submetido à ativação mediada por enzimas nitroredutases para exercer seus efeitos tóxicos (Wilkinson & Kelly, 2009). Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que o benznidazol age através de

estresse redutivo, o qual envolve reações covalentes de macromoléculas pela nitrorredução de radicais intermediários e vários componentes celulares, como RNA, lipídeos e proteínas de *T. cruzi* (Docampo, 1990). Também atua sobre o genoma do parasito, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas além de acelerar a degradação dessas macromoléculas. O menor potencial de atividade detoxificante do parasito contra os radicais livres formados o faz mais susceptível a tais intermediários oxigenados que as células dos vertebrados (Stoppani, 1999).



**Figura 1:** Fórmula estrutural do benznidazol [N-benzyl-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamide]

O benznidazol é eficaz principalmente quando utilizado para tratar a fase aguda da doença de Chagas. O tratamento é administrado por via oral, duas vezes ao dia, durante 60 dias. Devido à sua baixa solubilidade em água (Leonardi *et al.*, 2009) e consequentemente limitada absorção gastrointestinal, há a necessidade de se administrar elevadas doses desse fármaco (Lamas *et al.*, 2006). Dessa forma, o tratamento induz muitas reações adversas, e em muitos casos, os pacientes interrompem a administração do fármaco antes de completado o esquema terapêutico (Cançado, 2002; Coura & Castro, 2002). A descontinuação do tratamento pode contribuir para o fracasso terapêutico e para o aumento da chance de desenvolvimento de resistência do parasito ao fármaco.

O tratamento com benznidazol quando utilizado na fase crônica, período no qual a maioria dos indivíduos é diagnosticada, apresenta reduzida eficácia, com taxas de cura variáveis, desde ausência até 19,1% de cura (Ferreira, 1990; Viotti *et al.*, 1994, 2006; Suasnábar *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2000; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Cançado, 2002; Lana, *et al.*, 2009). As razões para diferenças na eficácia do benznidazol nas fases aguda e crônica ainda não estão totalmente claras, mas alguns pesquisadores sugerem que possivelmente estão relacionadas às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco, como a meia-vida relativamente curta e a limitada penetração tecidual (Lamas

*et al.*, 2006, Urbina, 2009). Além disso, há cepas do parasito que são naturalmente resistentes ao tratamento com benznidazol e nifurtimox (Filardi & Brener, 1987).

Dadas as limitações apresentadas pelo tratamento etiológico disponível para a doença de Chagas, é evidente a necessidade da busca por novas drogas e/ou estratégias terapêuticas para os milhões de indivíduos na fase crônica da doença. Além da triagem empírica de substâncias, novos alvos para o desenvolvimento de terapias anti-*T. cruzi* são propostos com base nos estudos acerca das vias fisiológicas, bioquímicas e moleculares do parasito e do hospedeiro (Urbina, 2009). A pesquisa racional aborda ainda alvos farmacológicos baseados em vias metabólicas do parasito compartilhadas com outros microorganismos, o que possibilita a avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de compostos utilizados para outras etiologias já licenciados para uso humano.

Apesar do grande número de moléculas avaliadas experimentalmente *in vitro*, poucos são os compostos que apresentaram capacidade de induzir cura parasitológica ou interferir na evolução da doença em modelos animais. Os estudos pré-clínicos realizados ao longo dos anos identificaram algumas classes farmacológicas e estratégias terapêuticas que são especialmente promissoras. Dentre essas prováveis alternativas, alguns compostos destacam-se por serem capazes de induzir cura parasitológica na infecção experimental, como os inibidores da biossíntese de ergosterol (Molina *et al.*, 2000; Urbina & Docampo, 2003), inibidores da cruzipaina (Engel *et al.*, 1998), derivados nitroimidazólicos (Bahia *et al.*, 2012) ou de interferir no curso da infecção, como as arilimidamidas (Soeiro *et al.*, 2013), inibidores da tripanotona redutase (Blau *et al.*, 2013), complexos de rutênio carreadores de moléculas com atividade tripanocida (Silva *et al.*, 2010) e inibidores da via de salvação de purinas.

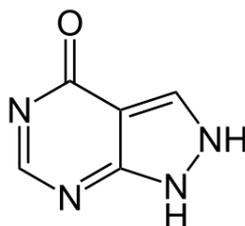
Dentre todos os compostos já estudados como alternativas para o tratamento da doença, dois inibidores da biossíntese de ergosterol, o posaconazol e o E1224 (pró-fármaco do ravuconazol) foram avaliados recentemente em ensaios clínicos de fase II, para o tratamento de indivíduos assintomáticos na fase crônica da doença de Chagas. Os inibidores da biossíntese de esteróis, a exemplo dos derivados azólicos desenvolvidos originalmente como antifúngicos, afetam a síntese de ergosterol, o esterol mais abundante na membrana celular de *T. cruzi* e indispensável à proliferação desse protozoário. Especialmente os inibidores da enzima 14 $\alpha$ -demetilase (CYP51), que bloqueiam a síntese de ergosterol do parasito sem interferir na biossíntese de colesterol do hospedeiro, são em conjunto os mais promissores candidatos para o tratamento da doença de Chagas. O posaconazol e o E1224 foram escolhidos para avaliação em

ensaios clínicos devido à potente atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Urbina, 2009). Entretanto, os resultados de ambos os ensaios clínicos evidenciaram que apesar do posaconazol e E1224 apresentarem perfil favorável de segurança e toxicidade, falharam em induzir cura parasitológica em cerca de 90% dos pacientes tratados (Israel Molina, International Congress of Tropical Medicine, disponível em [http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/program\\_25\\_sept.html](http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/program_25_sept.html); Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene November 2013). Esses estudos mostraram a necessidade de buscar novos fármacos e/ou protocolos de tratamento mais eficazes para os pacientes.

## 1.2. Os inibidores da via de salvação de purinas

Entre os alvos terapêuticos para o tratamento anti-*T. cruzi* encontram-se os inibidores da via de salvação de purinas, sendo a enzima chave desta via a hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT). Como os parasitas tripanossomatídeos são absolutamente deficientes na biossíntese de novo de purinas, eles obtêm essas substâncias essenciais a partir do organismo de hospedeiros vertebrados ou mesmo do meio de cultura (Urbina, 2007).

O alopurinol (figura 2) é um medicamento que tem sido utilizado durante muitos anos para o tratamento da hiperuricemia humana, sendo transformado em oxipurinol, um potente inibidor de xantina oxidase. Seu mecanismo de ação contra o *T. cruzi* consiste na utilização desse fármaco pela enzima HGPRT do parasito como um substrato alternativo, sendo então, incorporado ao seu RNA, gerando um nucleotídeo não funcional, o que leva à morte do parasito (Marr & Berens, 1978).



**Figura 2:** Fórmula estrutural do alopurinol [1,5-diidro-4H-pirazol[3,4-d]-pirimidina-4-ona]

O alopurinol já foi avaliado experimentalmente e na doença de Chagas humana, tanto em fase aguda quanto crônica. Ávila e Ávila (1981) demonstraram o benefício do tratamento com o alopurinol na infecção aguda de camundongos por *T. cruzi*. A administração intraperitoneal desse fármaco foi capaz de controlar a infecção, uma vez

que os níveis de parasitemia a taxa de mortalidade foram significativamente reduzidos após a intervenção terapêutica. De forma semelhante, Gobbi *et al* (2007) também identificaram que o alopurinol foi eficaz em modificar a evolução da infecção aguda pelo *T. cruzi* em camundongos. Os resultados obtidos demonstraram uma redução na parasitemia, porém não foi observada redução nas alterações eletrocardiográficas causadas pela infecção nem diminuição nos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* em relação aos animais infectados não tratados.

Já os resultados das avaliações de eficácia do alopurinol no tratamento da doença humana apresentam-se controversos. Em ensaio clínico realizado para o tratamento de indivíduos na fase aguda da infecção o alopurinol foi ineficaz, uma vez que a hemocultura e a sorologia permaneceram positivas nos pacientes após a intervenção terapêutica (Lauria-Pires *et al*, 1988). De forma semelhante, um estudo multicêntrico realizado em pacientes crônicos na Argentina, Brasil e Bolívia, mostrou que o alopurinol foi ineficaz em reduzir a carga parasitária nos pacientes avaliados (Rassi, 2007).

Por outro lado, um estudo realizado com pacientes residentes na Argentina (Gallerano, 1990) demonstrou que o tratamento com alopurinol apresentou eficácia semelhante à obtida com benznidazol e nifurtimox no tratamento da fase crônica da doença de Chagas, porém com menor indução de efeitos adversos. Resultados semelhantes foram obtidos por Apt *et al.* (1998) em um ensaio clínico com pacientes na fase crônica da doença no Chile. De acordo com esse autor, demonstrou-se que o alopurinol foi capaz de induzir diminuição na positividade dos testes xenodiagnósticos em 44% dos pacientes avaliados, além de reverter ou prevenir o desenvolvimento de alterações eletrocardiográficas após nove anos de seguimento. A avaliação destes mesmos pacientes nove anos após o estudo inicial demonstrou que o tratamento com alopurinol também foi eficaz em induzir redução das alterações eletrocardiográficas (Apt *et al.*, 2003).

Neste cenário, outros compostos capazes de inibir a HGPRT em *T. cruzi* com estruturas análogas ao alopurinol têm sido desenvolvidos e testados *in vitro*, mas a atividade *in vivo* ainda não foi estabelecida (Raviolo, 2013). Assim, tendo em vista o limitado avanço no desenvolvimento pré-clínico, ensaios com inibidores da HGPRT para o tratamento da doença de Chagas humana só podem ser esperados a médio e longo prazo.

#### 1.4 A terapia de combinação de fármacos no tratamento da infecção por *T.cruzi*

Como as perspectivas para a introdução de novos compostos na quimioterapia da doença de Chagas pela indústria farmacêutica são pequenas, uma estratégia alternativa envolve a identificação de candidatos, entre os medicamentos já disponíveis no mercado, que poderiam ser usados em combinação para fornecer um resultado mais eficaz na terapêutica. Essa estratégia pode permitir a rápida inserção destes medicamentos no uso clínico (Dias & Dessoy, 2009).

A combinação de compostos é uma estratégia já utilizada com sucesso no tratamento de várias patologias, como doenças cardiovasculares, câncer e algumas doenças infecciosas, como tuberculose e AIDS, além de protozoonoses como toxoplasmose (Romand, 1993), leishmaniose (Dastgheib, 2012) e malária (Hwang,2006), inclusive no tratamento de indivíduos infectados por populações de microorganismos resistentes (Fivelman *et al.*, 2004).

Neste cenário, a avaliação da terapia de combinação é importante, especialmente a curto prazo, apresentando vantagens como: (i) redução do tempo e dose do tratamento (minimizando a toxicidade, enquanto mantém a eficácia), (ii) uso de compostos que podem atuar sobre diferentes elementos celulares e vias metabólicas, (iii) redução do potencial de desenvolvimento de resistência aos fármacos (Vivas *et al.*, 2008).

Araújo *et al.* (2000) avaliaram a eficácia da terapia de combinação de benznidazol e cetoconazol em camundongos infectados por cepas de *T. cruzi* que apresentam diferentes níveis de susceptibilidade ao benznidazol. Os resultados obtidos demonstraram que a combinação induz um efeito positivo em camundongos infectados pelas cepas CL e Y, o que não foi observado nos animais infectados pela cepa Colombiana.

Derivados azólicos utilizados em combinação com inibidores da biossíntese de ergosterol, que atuam em outros pontos da via de biossíntese do ergosterol, conduziram a um efeito positivo anti-*T. cruzi* (Lazardi *et al.* 1990, Maldonado *et al.* 1993). Urbina *et al.* (1998) mostraram *in vitro*, a interação entre dois inibidores da biossíntese do ergosterol, o cetoconazol e uma alilamina (SF-86327). Essas drogas atuam em diferentes pontos da via biossintética do ergosterol, quando utilizadas em combinação, apresentaram interação sinérgica na eliminação de formas epimastigotas e amastigotas

do parasito. Além disso, Benaim *et al.*, (2006) identificaram que a atividade anti-*T. cruzi* do composto antiarrítmico amiodarona é potencializado pelo posaconazol.

Diniz *et al.* (2013) também investigaram a ação curativa do benznidazol em combinação com o posaconazol. Animais infectados pela cepa Y de *T. cruzi* foram tratados com 25, 50, 75 ou 100 mg/kg/dia de benznidazol e com 5, 10 ou 20 mg/kg de posaconazol, administrados separadamente ou em combinação por 20 dias. Os autores observaram que os índices de cura obtidos nos tratamentos combinados foram maiores do que a soma daqueles verificados com a administração de cada droga separadamente, indicando um claro efeito benéfico da terapia de combinação.

O alopurinol também já foi avaliado em combinação com diferentes fármacos e sua eficácia no tratamento doença de Chagas já foi estabelecida por alguns esquemas de tratamento. Dessa forma, a associação da clomipramina e do alopurinol na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* demonstrou melhora nos parâmetros de parasitemia, sobrevivência, eletrocardiograma, sorologia e histopatologia cardíaca, mas os mesmos efeitos foram verificados quando a clomipramina foi utilizada isoladamente.

Além disso, tratamento com alopurinol foi avaliado quando administrado após o tratamento com benznidazol, em diferentes esquemas, na fase aguda ou crônica da infecção de camundongos. Verificou-se que o alopurinol administrado imediatamente após o tratamento com benznidazol foi capaz de reduzir a parasitemia, a inflamação, o dano tecidual, além de reduzir os anticorpos específicos anti-*T. cruzi*. O esquema de tratamento utilizando o alopurinol durante a fase crônica, após a terapia com benznidazol na fase aguda, apresentou um maior efeito benéfico, através da redução da parasitemia e do grau de inflamação e fibrose (Grosso *et al.*, 2013).

Dado o grande potencial da terapia de combinação de fármacos, Perez-Mazliah *et al* (2012) realizaram um estudo piloto para avaliar os efeitos do tratamento combinado de forma sequencial com alopurinol e benznidazol na fase crônica da infecção humana pelo *T. cruzi*. Os resultados mostraram que esta combinação induz modificações significativas das respostas imunológicas induzidas por células T e B, que seriam indicativas de uma redução da carga parasitária.

Considerando a necessidade de novas alternativas de tratamento para a doença de Chagas e especialmente o arsenal limitado de compostos que apresentam alguma atividade na infecção por *T. cruzi*, é clara a necessidade de busca de novas estratégias ou protocolos de tratamento utilizando os medicamentos já disponíveis.

## **2 JUSTIFICATIVA**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças podem ser classificadas como globais, negligenciadas e extremamente negligenciadas. Para doenças negligenciadas, a exemplo da doença de Chagas, leishmanioses, malária, tuberculose, não há investimento das indústrias farmacêuticas tradicionais em pesquisa, devido à falta de mercado significativo. Um estudo recente mostrou que dos 850 novos produtos farmacêuticos registrados de 2000 a 2011, apenas 1% corresponde a novos medicamentos para a terapia das doenças negligenciadas cujo impacto é global estimado em 11% (Pedrique *et al.*, 2013).

Com relação à infecção por *T. cruzi*, na América Latina, as taxas de morbidade e mortalidade são maiores do que as relacionadas com a malária, a esquistossomose e a leishmaniose, caracterizando a doença de Chagas como um grave problema de saúde pública das nações em desenvolvimento ([www.dndi.org](http://www.dndi.org)). Os dois medicamentos utilizados para o tratamento dessa enfermidade, o benznidazol e o nifurtimox, induzem índices de cura absolutamente insatisfatórios quando utilizados no tratamento da fase crônica da doença, a mais prevalente em regiões endêmicas e não endêmicas. Além disso, outra limitação diz respeito à ocorrência de reações adversas em decorrência do tratamento com ambos os fármacos.

Nessa perspectiva, é evidente a necessidade de avaliação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. Atualmente, a terapia de combinação de fármacos apresenta-se como a perspectiva mais otimista na área de quimioterapia experimental da infecção por *T. cruzi*. A utilização de associações de compostos que apresentem algum efeito no decurso da infecção por *T. cruzi* pode levar à identificação de combinações de fármacos que induzam maior eficácia no tratamento ou mesmo possibilitem a redução nas doses dos medicamentos ou mesmo otimização do protocolo terapêutico.

O alopurinol é um medicamento utilizado na clínica contra hiperuricemia, além disso, diversos estudos já fundamentaram sua avaliação na infecção por *T. cruzi*. Sendo o benznidazol o fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas, o presente trabalho justifica-se por avaliar as combinações de ambos os fármacos, pois, no caso de identificação de uma interação positiva entre eles, essa combinação apresenta viabilidade imediata para utilização no tratamento de indivíduos infectados pelo parasito.

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1.Objetivo geral

Avaliar o efeito da terapia de combinação utilizando benznidazol associado ao alopurinol *in vitro* e *in vivo* na infecção por *Trypanosoma cruzi*.

### 3.2.Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente a atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos benznidazol e alopurinol isoladamente ou em combinação utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*;
- Identificar o efeito do tratamento com diferentes doses de benznidazol e alopurinol, em monoterapia ou em combinação, na evolução da infecção aguda de camundongos pela cepa Y de *T. cruzi* através dos parâmetros: exame de sangue a fresco e PCR.
- Avaliar o efeito das combinações do benznidazol e alopurinol na resposta imune humoral, através da dosagem dos níveis de anticorpos IgG anti-*T.cruzi* detectados no soro dos animais.

## **4 METODOLOGIA**

#### **4.1. Parasito**

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

#### **4.2. Fármacos**

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

- Benznidazol (Bz): 2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitro-1imidazoleacetamide) (Lafepe).
  
- Alopurinol (Al): 4-hidroxi-pirazol(3,4-*d*)pirimidina (Zyloric®, GlaxoSmithKline).

#### **4.3. Experimentos *in vitro***

##### **4.3.1. Cultivos de células H9c2**

Células da linhagem H9c2 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL 1446) provenientes do coração de ratos neonatos foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina 2 mM e 0,2% de gentamicina 200 µg/ml. Garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo estas células foram mantidas em estufas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> e tripsinizadas semanalmente ou quando atingiam confluência para manutenção constante ou quando utilizadas em experimentos.

### 4.3.2. Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular

As formas tripomastigotas da cepa Y utilizadas para infectar as células H9c2 foram obtidas a partir do sobrenadante de cultura de células infectadas. Para isso, células H9c2 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Ao atingir cerca de 70% de confluência, a cultura foi infectada, na proporção de 10 parasitos por célula, com tripomastigotas sanguíneos oriundos do sangue de camundongos infectados pela cepa Y, no pico de parasitemia, que corresponde ao 8º dia de infecção. Após 24 horas de incubação a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e os parasitos não internalizados, bem como detritos celulares, foram retirados através de sucessivas lavagens com PBS. Às células, foi adicionando meio DMEM suplementado com 10% de SFB, e novamente incubadas a 33° C por 72 a 96 horas, quando o sobrenadante foi coletado e centrifugado, a 600rpm, 24 °C, por 2 minutos, para remoção dos debris celulares. Posteriormente, o sobrenadante, rico em parasitos, foi centrifugado a 3000 rpm, 4 °C, 15 minutos e o sedimento ressuspensionado em meio de cultura para posterior utilização nos experimentos. Apenas parasitos recém-liberados das células foram utilizados nos experimentos, uma vez que o sobrenadante era periodicamente coletado e meio de cultura fresco era novamente adicionado.

### 4.3.3. Ensaios de citotoxicidade

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

Assim, duzentos microlitros de suspensão das células H9c2, na concentração de  $5 \times 10^3$  células/mL, foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio contendo ou não concentrações decrescentes de benznidazol (6 diluições 1:2, a partir de

200  $\mu\text{M}$ ) ou alopurinol (6 diluições 1:2, a partir de 1000  $\mu\text{M}$ ) isoladamente ou em combinação, e a placa novamente incubada por 72 horas, a 37 °C. Foram adicionados a cada placa: controles negativos (meio+resazurina), controles negativos (meio), controles positivos (meio+células), controles para avaliar o potencial dos fármacos (meio+droga, na ausência de parasitos) ou do DMSO (meio+DMSO) em reduzir o corante. A fim de avaliar a eficácia do método em detectar a morte celular, foram utilizadas concentrações decrescentes de DMSO sabidamente tóxicas para as células. Após as 72 horas de incubação, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de resazurina 1 mM a cada poço e a placa foi submetida a leitura espectrofotômetro de microplacas (570 nm e 600 nm). A porcentagem de inibição da proliferação induzida pelos compostos foi calculada considerando o percentual de redução das células incubadas na ausência de drogas.

#### **4.3.4. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* dos fármacos benznidazol e alopurinol sobre formas amastigotas: definição da IC-50**

A avaliação do efeito do tratamento com benznidazol e alopurinol sobre amastigotas da cepa Y foi realizada em células H9c2 infectadas. Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células por poço, sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro, em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ . Formas tripomastigotas originadas de cultura de células, obtidas conforme descrito anteriormente, foram utilizadas para infecção em uma razão de 20:1 (parasitos:células). Após 24 horas de interação, o sobrenadante foi removido e cada poço foi lavado no mínimo três vezes com PBS estéril, a fim de remover os parasitos não internalizados. Meio de cultura fresco contendo ou não os fármacos em diferentes concentrações foi adicionado a cada poço, em um volume total de 1 mL. As células foram novamente incubadas por 72 h, a 37 °C. As concentrações iniciais de cada composto foram definidas a partir de experimentos preliminares (dados não mostrados).

Em todos os experimentos foram utilizados controles, que corresponderam a células não infectadas e tratadas, não infectadas e não tratadas, infectadas e não tratadas. As lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol por cinco minutos e em seguida, coradas pela solução de Giemsa (10% em água destilada). Foram quantificados o número de células infectadas e o número de amastigotas por célula utilizando microscópio óptico. As imagens das células, visualizadas pela objetiva de 40x, foram digitalizadas através de microcâmera Leica DM 5000 B (Leica Application Suite, versão 2.4.0R1). A determinação do efeito de cada uma das concentrações dos

fármacos isoladamente ou em combinação foi feita utilizando o índice do endocítico, que corresponde à média da percentagem de células infectadas multiplicada pelo número médio de amastigotas por célula. O índice endocítico observado nas células incubadas com os diferentes fármacos isoladamente ou em combinação foi utilizado para calcular o percentual de inibição da infecção com relação às células infectadas e não tratados.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [ \text{IE}_{\text{Tratado}} / \text{IE}_{\text{Controle+}} ] \times 100$$

A partir desses valores foram construídas as curvas de dose-efeito e cálculo da IC<sub>50</sub> com auxílio dos softwares *Graph Pad Prism 5* e *CalcuSyn*. Todos os experimentos com amastigotas foram realizados em duplicatas, com no mínimo 2 repetições.

#### 4.3.5. Avaliação da interação de benznidazol e alopurinol sobre formas amastigotas

Para avaliar o efeito da combinação de benznidazol e alopurinol foi utilizado o método de diluição do “tabuleiro de damas”. Concentrações fixas de alopurinol (500, 100 ou 10 5 µM) foram associadas a diferentes concentrações de benznidazol (5; 2,5; 1,25 ou 0,625 µM), como pode ser observado na figura 3. Além da avaliação do efeito das combinações, em cada experimento foi também realizada a incubação com os fármacos isoladamente. As células permaneceram na presença dos fármacos por 72 horas. Após esse período foram fixadas e coradas pelo Giemsa.

|             |             |             |             |            |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| Al<br>500µM | Bz 5 µM     | Al<br>100µM | Bz 5 µM     | Al<br>10µM | Bz 5 µM     |
|             | Bz 2,5 µM   |             | Bz 2,5 µM   |            | Bz 2,5 µM   |
|             | Bz 1,25µM   |             | Bz 1,25 µM  |            | Bz 1,25 µM  |
|             | Bz 0,625 µM |             | Bz 0,625 µM |            | Bz 0,625 µM |

**Figura 3: Desenho esquemático do método de “tabuleiro de damas” de diluição de fármacos para testes de combinação *in vitro*.** Foram utilizadas concentrações fixas de alopurinol (500, 100 ou 10 µM) e associadas a diferentes concentrações de benznidazol (5; 2,5; 1,25 ou 0,625 µM). Al - Alopurinol, Bz- benznidazol.

Como controles, foram avaliadas células não infectadas e tratadas, não infectadas e não tratadas, infectadas e não tratadas, a fim de avaliar toxicidade da terapia combinada, bem como células infectadas e não tratadas. A infecção e o tratamento das células foram realizados como descrito anteriormente. Após 72 horas de incubação a 37°C, o sobrenadante foi removido, e as células então lavadas em PBS, fixadas e coradas para avaliação do índice endocítico, bem como o percentual de inibição da infecção, como já descrito.

#### **4.3.6. Análise estatística – experimentos *in vitro***

Os valores de IC-50 (concentração de fármaco que induz 50% do efeito) foram obtidos através do *software CalcuSyn*, que utiliza o plot de efeito médio (*median effect plot*).

Para classificar a natureza da interação entre alopurinol e benznidazol *in vitro*, foi inicialmente estimado o índice de combinação (CI-combination index), utilizando um programa estatístico específico para análise de combinações de compostos, o *CalcuSyn*. A partir desses valores foi classificada a presença e natureza da interação entre dois compostos. Se o  $CI \leq 0,5$  indica interação sinérgica; se  $>0,5$  e  $\leq 4$ , ausência de interação ou efeito aditivo e se  $>4$ , indica antagonismo (Seifert *et al.*, 2006, 2011). Os isobogramas, que são a representação gráfica do efeito das combinações, foram construídos plotando-se o CI do alopurinol *versus* CI do benznidazol (Chou e Talalay, 1984).

### **4.4. Experimentos *in vivo***

#### **4.4.1. Modelo Animal**

Todos os experimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), além de serem aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFOP (número 2009/17). Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com idade variando entre 28 a 30 dias, pesando entre 18 e 22 g. Os animais foram fornecidos e mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

#### 4.4.2. Infecção e esquema de tratamento

Animais inoculados intraperitonealmente com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y foram divididos em grupos de 10 animais, os quais receberam os compostos em diferentes doses isoladas ou em combinações de benznidazol e alopurinol. Todos os compostos foram suspensos em água destilada usando 4% metilcelulose (Sigma®) e cada animal recebeu, de acordo com seu peso corporal, a suspensão do(s) fármaco(s) por gavagem.

Os grupos controle, utilizados para a comparação de eficácia do tratamento foram: um grupo não tratado, tratados com 100, 75, 50 e 25 mg/kg de benznidazol (Bz) e 90, 60, e 30 mg/kg de alopurinol (Al), em monoterapia.

Nos grupos que receberam a terapia combinada a administração foi assim realizada:

*Grupo 1 - 75 mg de Bz por quilo de peso + 30 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 2 - 75 mg de Bz por quilo de peso + 60 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 3 - 75 mg de Bz por quilo de peso + 90 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 4 - 50 mg de Bz por quilo de peso + 30 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 5 - 50 mg de Bz por quilo de peso + 60 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 6 - 50 mg de Bz por quilo de peso + 90 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 7 - 25 mg de Bz por quilo de peso + 30 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 8 - 25 mg de Bz por quilo de peso + 60 mg de Al por quilo de peso*

*Grupo 9 - 25 mg de Bz por quilo de peso + 90 mg de Al por quilo de peso*

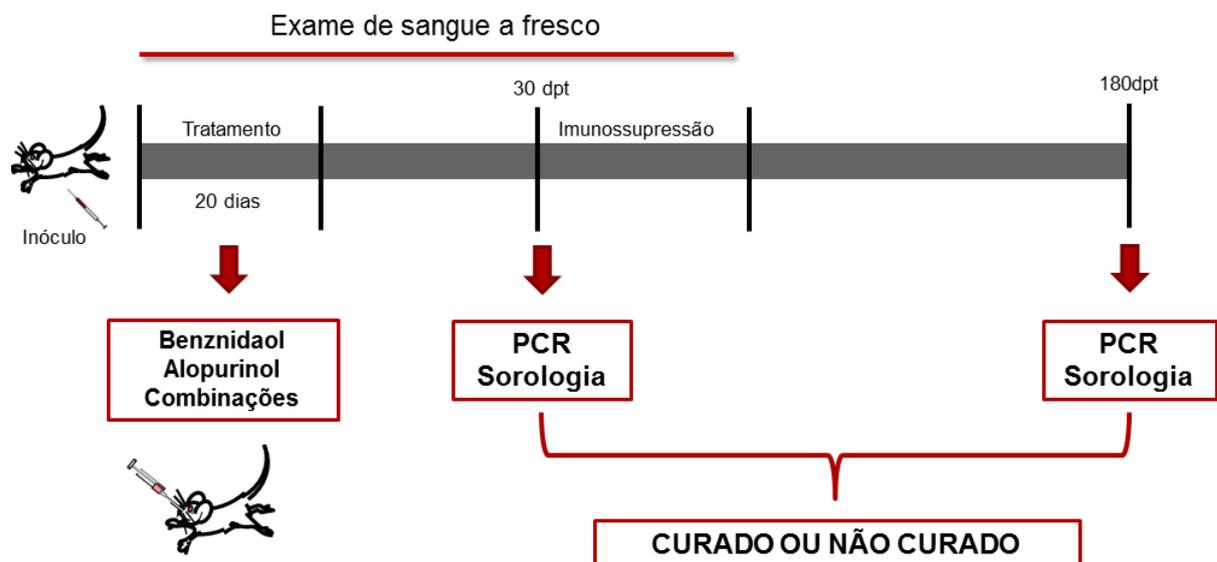
O tratamento foi iniciado imediatamente após a detecção de parasitemia patente, que corresponde ao quarto dia após a inoculação dos animais, e administrado por 20 dias consecutivos para todos os grupos.

#### 4.4.3. Avaliação da eficácia do tratamento

A cura parasitológica foi determinada a partir da análise de testes independentes (Caldas *et al.*, 2008): exame de sangue a fresco antes e após imunossupressão com ciclofosfamida (Baxter Oncology, Alemanha), além do teste de PCR em tempo real 30 e

180 dias após o tratamento. Os animais foram considerados curados quando apresentaram resultados negativos em todos os testes realizados.

A parasitemia foi avaliada durante e até 30 dias após o tratamento para detectar a ocorrência da supressão (durante o tratamento) e/ou a reativação natural da parasitemia após o término do tratamento. Os animais que não apresentaram a reativação da parasitemia nesse período foram submetidos a três ciclos de imunossupressão com ciclofosfamida (Baxter Oncology, Alemanha). Cada ciclo corresponde a administração por 4 dias consecutivos, com intervalo de 3 dias entre cada ciclo. A parasitemia foi avaliada diariamente durante e até 10 dias após a imunossupressão. A PCR e sorologia foram realizadas 30 e 180 dias após o tratamento apenas nos animais que apresentaram resultados negativos nos testes anteriores (Figura 4).



**Figura 4:** Representação cronológica do experimento utilizado para avaliação de cura. Os camundongos foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com 25, 50, 75 e 100 mg/kg de benznidazol e 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol em monoterapia ou em combinação. Foi realizado exame de sangue a fresco antes e após a imunossupressão com Ciclofosfamida e coletas de sangue para PCR e sorologia 30 e 180 dias após o fim do tratamento. (dpt: dias pós tratamento).

#### 4.4.4. Exame de sangue fresco

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

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

A PCR de sangue periférico foi realizada em dois momentos: 30 dias e 180 dias após o fim do tratamento. Foram coletados 200 µL de sangue de cada camundongo pelo plexo venoso retro-orbital e adicionados a 35 µL de solução de citrato de sódio com concentração de 129 mM. O material foi armazenado a 4-8 °C até o momento da extração, realizada no mesmo dia. Para a extração do DNA genômico foram transferidos os 200 µL de sangue coletado de cada animal para microtubos de 1,5 mL contendo 600 µL de Solução de Lise Celular (Wizard® Genomic). Este conteúdo foi homogeneizado por lenta inversão (seis vezes) e mantido a temperatura ambiente por 10 minutos. Os microtubos foram centrifugados por 40 segundos a 14000 rpm e o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta, restando apenas 10-20 µL de líquido residual, os quais foram levados ao vórtex por 30 segundos, a fim de haver a ressuspensão das células brancas do sangue. Posteriormente foram adicionados 200 µL de solução de lise nuclear (Wizard® Genomic), os quais foram incubados por 60 minutos em banho-maria a 37°C. Os microtubos foram retirados do banho-maria, e após 10 minutos, quando atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 67 µL da solução de precipitação protéica (Wizard® Genomic) aos microtubos, os quais foram homogeneizados em vórtex por 30 segundos e, posteriormente, centrifugados por 4 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante de cada amostra contendo o DNA foi transferido para novos microtubos de 0,6 mL, contendo 200 µL de isopropanol. Os microtubos foram invertidos cerca de 10 vezes e agitados para que houvesse a precipitação do DNA e centrifugados por 90 segundos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de etanol 70% seguido de centrifugação por 90 segundos a 14000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o microtubo foi invertido sobre papel absorvente para secagem por cerca de 30 minutos, sendo o DNA reidratado em seguida com 67µL da solução de reidratação (Wizard® Genomic) e incubado a 4° C por 48 horas.

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2 µL de DNA genômico (50 ng), 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a repetição de 195 pares de bases (pb) do DNA de *T. cruzi*, TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', onde M = A ou C (Invitrogen), e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', (Moser *et al.* 1989, modificado por Cummings & Tarleton 2003) o qual amplifica um produto de 182 pb, 5 µL de *Sybr®Green PCR Mastermix*, e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 10 µL. Separadamente, para cada amostra era também realizada uma reação em duplicata para dosar o TNF-α, utilizado como controle endógeno normalizador contendo 2 µL de DNA genômico (50 ng), 0,50 µM de oligonucleotídeos iniciadores TNF-5241 5'-TCCCT CTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCA TCTATGCACTTAGACCCC-3' (Cummings & Tarleton, 2003), o qual amplifica um produto de 170 pb, 5µL de “*Sybr® Green PCR Mastermix*”, e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 10 µL. As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (*Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™*), centrifugadas por 2 minutos a 200 x g e levadas ao termociclador *StepOnePlus (Applied Biosystems)*. O programa de termociclagem consistia de aquecimento a 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 94° C por 15 segundos e 64,3° C por 1 minuto, com aquisição da fluorescência a 64,3° C. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de *melting* com desnaturação inicial a 95° C por 15 segundos, resfriamento a 60° C por 1 minuto e aumento gradual de temperatura de 0,3° C/s até 95° C. Cada placa continha um controle negativo da extração (proveniente de camundongo normal), em duplicata, para sangue, e um controle negativo da PCR, em duplicata, com água no lugar de DNA, para a reação com oligonucleotídeos iniciadores de *T. cruzi* e do TNF-α (Cummings & Tarleton, 2003).

#### 4.4.6. Mortalidade

A taxa de mortalidade foi calculada pela observação diária dos animais durante e até 30 dias após o término do tratamento. Os resultados foram expressos em percentagens.

#### 4.4.7. Avaliação Sorológica

Para esta avaliação foi realizada a coleta de sangue 30 e 180 dias após o tratamento. Foram coletados aproximadamente 500 µL de sangue não heparinizado do seio venoso retro-orbital dos camundongos e transferido para tubos eppendorf de 1,5 mL, sendo estes centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos. Os soros foram armazenados em novos

tubos e estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a realização da técnica, foram utilizados antígenos da forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*, obtidos de cultivo acelular em meio LIT. Como conjugado foram utilizadas anti-imunoglobulinas de camundongo IgG marcadas com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA).

O ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) foi realizado segundo a metodologia descrita por Voller *et al.*, (1976), com algumas modificações. O teste foi executado em placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato. Cada poço da placa foi tratado com extrato antigênico de epimastigotas, na concentração definida previamente por titulação em bloco, diluído em solução tampão carbonato. As placas foram incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 18h e após este intervalo de tempo foram bloqueadas com PBS + SFB e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A próxima etapa consistiu na adição de soro de cada animal, e incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , na diluição 1:80. Posteriormente foi adicionado o conjugado, diluído em PBS-Tween, conforme titulação prévia, e as placas foram novamente incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, foi adicionada a solução de substrato (O-fenilenodiamino: OPD, solução de ácido cítrico e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e posteriormente a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO RAD, Modelo 3550) com filtro de 490nm. Em cada placa foram adicionados 10 soros negativos e quatro positivos como controle da reação. A absorbância discriminante, em cada placa, foi calculada tomando-se a média da absorbância dos 10 soros negativos somados a dois desvios padrões. Posteriormente foi calculado o índice de reatividade, dividindo o valor da absorbância de cada amostra encontrada pela absorbância discriminante.

#### **4.4.8. Análise estatística dos experimentos *in vivo***

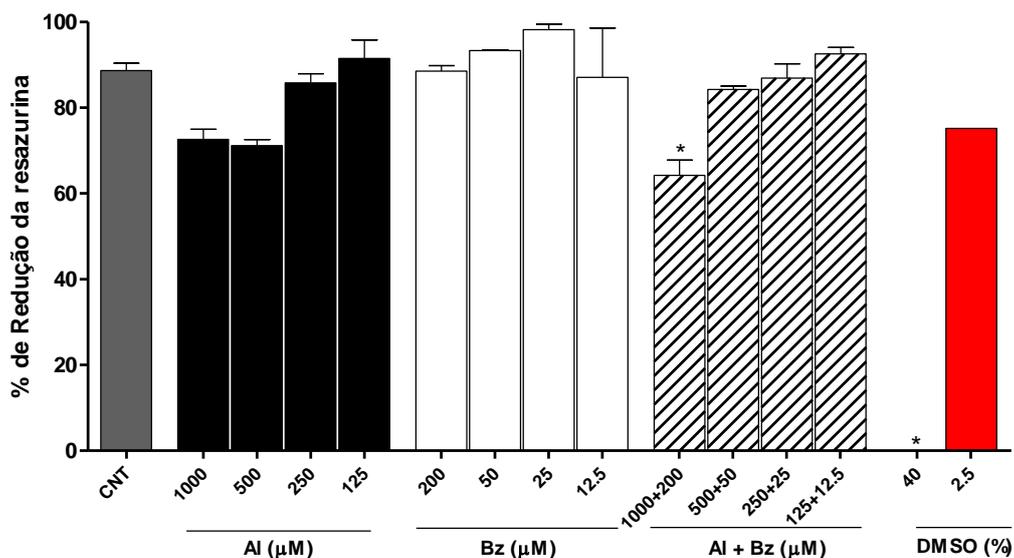
Os resultados dos níveis de parasitemia, níveis de anticorpos e peso dos animais foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão para cada conjunto de dados. As duas primeiras variáveis foram analisadas pelo teste não paramétrico Tukey de múltipla comparação. Os dados de peso foram avaliados pelo teste T de *Student*. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5. RESULTADOS**

## **5.1. Resultados *in vitro***

### **5.1.1. Determinação da citotoxicidade dos compostos avaliados e de suas combinações para células de mamíferos**

A fim de verificar a ocorrência de citotoxicidade para células de mamíferos decorrente da utilização de alopurinol e benznidazol, isoladamente e associados, a viabilidade de células H9c2 na presença ou ausência de altas concentrações desses fármacos foi avaliada utilizando o método de redução da resazurina. A utilização de concentrações de até 1000  $\mu\text{M}$  de alopurinol não induziu toxicidade na célula hospedeira. Para as células incubadas com as concentrações de 1000 e 500  $\mu\text{M}$  de alopurinol foram identificados percentuais de redução da resazurina cerca de 20% inferiores àqueles observados para as células incubadas apenas com meio de cultura, entretanto, essa diferença não foi significativa. Da mesma forma, não houve interferência na viabilidade celular com a utilização de até 200  $\mu\text{M}$  de benznidazol. Por outro lado, quando as maiores concentrações de cada fármaco foram utilizadas em combinação (Al 1000  $\mu\text{M}$  + Bz 200  $\mu\text{M}$ ) houve interferência significativa na viabilidade celular, induzindo inibição na proliferação das células tratadas quando comparadas às não tratadas (Figura 5). Já as combinações das demais concentrações não induziram a efeito tóxico para as células. Considerando esses resultados foram avaliadas concentrações de alopurinol a iguais ou menores que 500  $\mu\text{M}$ .

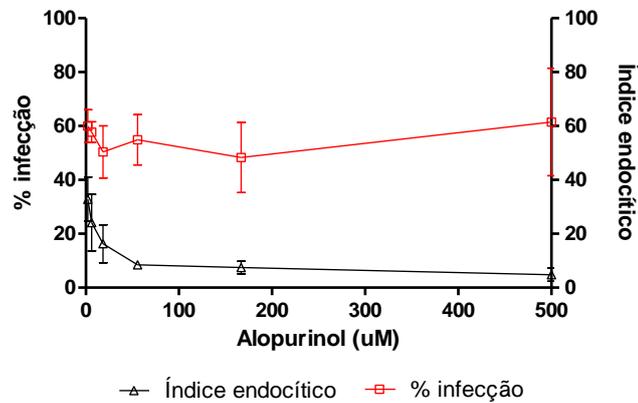


**Figura 5: Ensaio para avaliação da citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de alopurinol ou benznidazol isoladamente ou em combinação.** Percentual de redução da resazurina por células H9c2 incubadas por 72 horas com diferentes concentrações de alopurinol (Al), benznidazol (Bz), com combinações de alopurinol e benznidazol (Al+Bz) e com dimetilsulfóxido (DMSO). CNT – células não tratadas. A leitura da reação foi feita seis horas após a adição do corante. \* indica diferença significativa, com relação ao controle não tratado, ao nível de  $p < 0,001$ .

### 5.1.2. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* do alopurinol e do benznidazol utilizando células H9c2 infectadas pela cepa Y

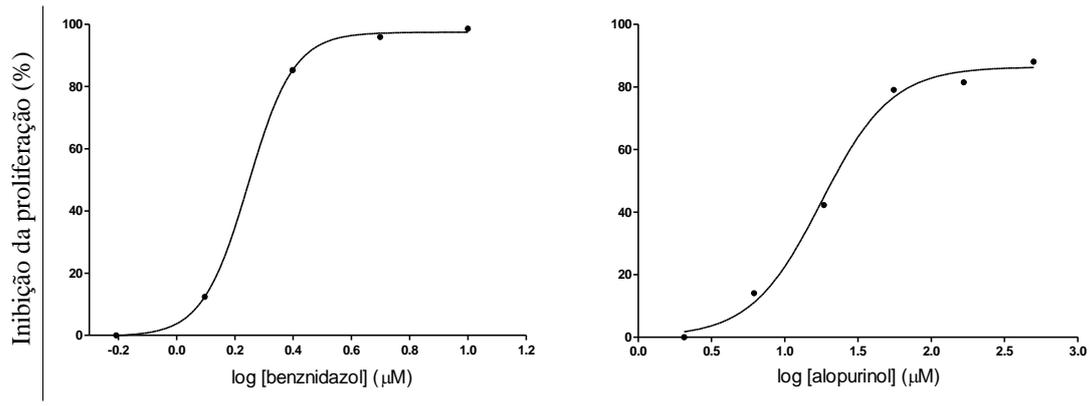
Inicialmente foi avaliado o efeito do alopurinol isoladamente ou em combinação com o benznidazol, sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*. A atividade das drogas foi estimada pelo cálculo do índice endocítico (IE); esse índice leva em consideração tanto o percentual de células infectadas quanto o número de amastigotas encontrado em cada célula. Nas células infectadas e incubadas apenas com meio de cultura foi observado percentual de infecção médio de  $35,5 \pm 3,08\%$  com intenso parasitismo das células, média de  $68,44 \pm 2,21$  amastigotas por célula infectada. A incubação das células com doses não tóxicas de alopurinol por 72 horas reduziu significativamente, e de forma dose-dependente, o índice endocítico (Figura 6 e 7). É interessante notar que esse fármaco foi eficaz em reduzir drasticamente o IE, entretanto, para as diferentes concentrações de alopurinol avaliadas, os percentuais de infecção

foram similares e ainda maiores que o percentual observado para as células não tratadas, mostrando que o composto não foi capaz de eliminar a infecção, mas interferiu intensamente na proliferação do parasito (Figura 6).



**Figura 6: Atividade alopurinol sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Dez mil células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença de concentrações decrescentes de alopurinol por 72 horas. Índice endocítico = % infecção x nº de amastigotas por célula infectada.

O benznidazol apresentou maior potência em inibir a infecção das células quando comparado com o alopurinol, uma vez que a redução significativa do índice endocítico foi observada com a utilização de concentrações de até 1,25 μM de benznidazol. A figura 7 mostra as curvas de dose-resposta para ambos os fármacos, construídas utilizando os valores de percentual de inibição da proliferação do parasito. Foram observados valores de IC-50 de 1,76 μM e 17,77 μM para o benznidazol e alopurinol, respectivamente.

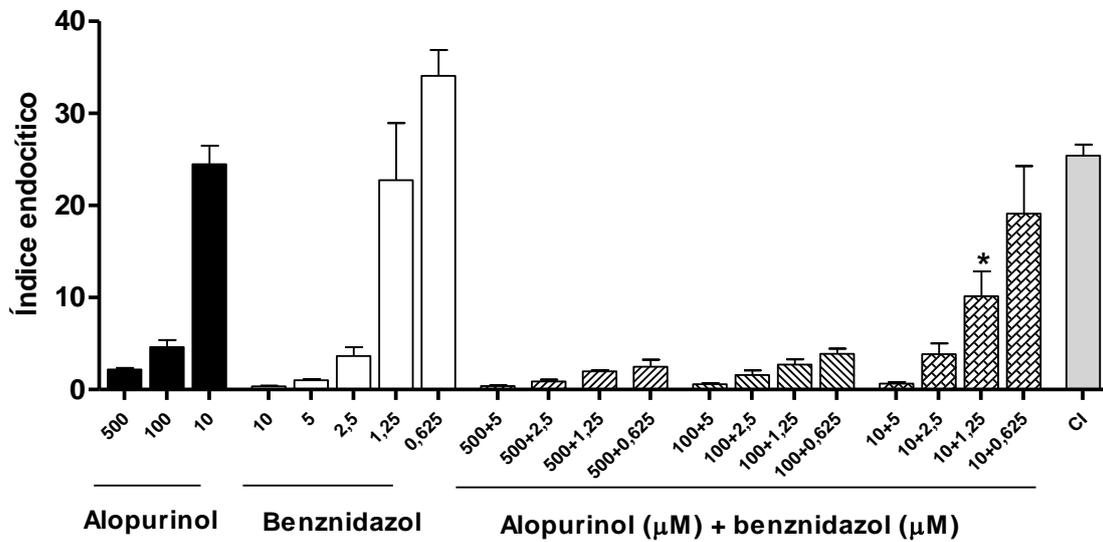


**Figura 7: Atividade do benznidazol (Bz) e do alopurinol (Al) utilizados isoladamente sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Dez mil células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de alopurinol e benznidazol, por 72 horas. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes. O IC-50 foi calculado utilizando-se o *software* *CalcuSyn*.

A partir desses resultados, foram definidas as concentrações de benznidazol e alopurinol para avaliação da terapia combinada *in vitro*. Foram avaliadas as concentrações de 500, 100 e 10 $\mu$ M de alopurinol associadas a diferentes concentrações de benznidazol (10;5; 2,5; 1,25; 0,625  $\mu$ M), afim de verificar a ocorrência de alguma interação entre esses compostos. A figura 8 representa os valores médios de índices endocíticos encontrados com a utilização dos diferentes fármacos, isoladamente e combinados. De forma geral, pode ser observada uma redução dose-dependente na infecção das células nos diferentes tratamentos; o alopurinol nas concentrações de 500 e 100 $\mu$ M induziu redução significativa ( $p < 0,0001$ ) do índice endocítico quando comparado às células não tratadas. Efeito similar foi alcançado com concentrações de até 2,5  $\mu$ M de benznidazol.

A utilização de ambos os compostos combinados teve um efeito positivo na inibição da infecção; a concentração de 500  $\mu$ M de alopurinol teve efeito similar à utilização das diferentes misturas de 500  $\mu$ M desse fármaco com benznidazol, provavelmente devido à eficácia da concentração utilizada. Resultado similar foi obtido quando utilizado 100  $\mu$ M de alopurinol. Nesse sentido, interação entre os dois fármacos pôde ser melhor visualizada nas combinações de menores concentrações. Quando 10  $\mu$ M de alopurinol foram associados a diferentes concentrações de benznidazol, o efeito foi dependente da concentração de benznidazol utilizada. De forma interessante, a combinação de 10  $\mu$ M de alopurinol associado a 1,25  $\mu$ M de benznidazol induziu uma

redução do índice endocítico de maneira significativa ( $p < 0,01$ ) quando comparado aos índices endocíticos dos fármacos utilizados isoladamente (Figura 8).



**Figura 8:** Atividade do benznidazol e do alopurinol isoladamente ou em combinação sobre o índice endocítico de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Dez mil células foram infectadas pela cepa Y e posteriormente incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação. \* indica diferença em relação às duas drogas administradas em monoterapia ( $p < 0,01$ ). CI: indica controle de células infectadas não tratadas

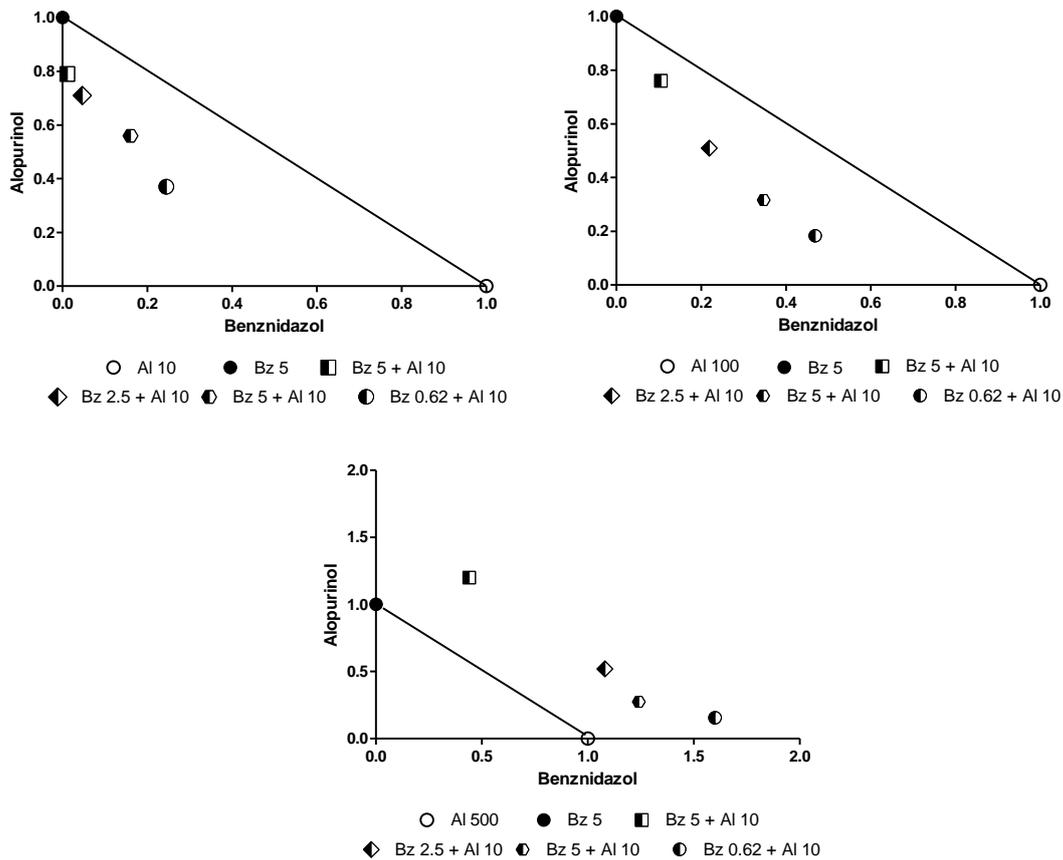
A análise comparativa dos índices endocíticos sugere um efeito aditivo resultante da utilização da associação entre alopurinol e benznidazol. Para confirmar esse resultado, foi realizado o cálculo do índice de combinação, utilizando o software *CalcuSyn* para a definição da natureza da interação entre os dois compostos. A tabela 1 mostra os valores de inibição da infecção bem como o índice de combinação estimado para cada tratamento. A utilização das diferentes combinações resultou em efeito aditivo ( $0,5 < CI < 4$ ), uma vez que os valores obtidos foram inferiores a 4. Valores mais próximos de uma interação sinérgica foram observados para as combinações utilizando as menores concentrações de cada fármaco (Tabela 1).

**Tabela 1: Efeitos anti-*Trypanosoma cruzi* do benznidazol e alopurinol em monoterapia ou em combinação no tratamento de células H9c2 infectadas pela cepa Y: % de inibição do índice endocítico em relação ao controle e índice de combinação.**

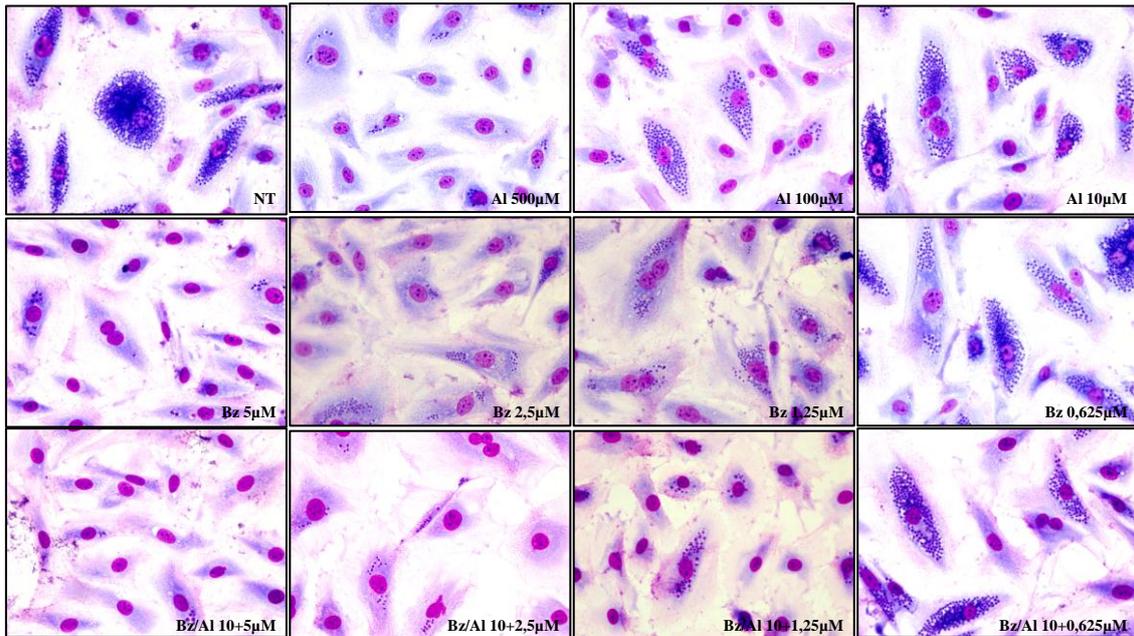
| <i>Fármacos</i>        | <i>% Inibição do índice endocítico (média ±DP)</i> | <i>Índice de combinação (média±DP)</i> |
|------------------------|--|--|
| Al - 500 µM            | 91,38±1,90   | -                                      |
| Al -100 µM             | 81,65±7,00   | -                                      |
| Al -10 µM              | 5,88±5,82  | -                                      |
| Bz-10 µM               | 98,595±0,39  | -                                      |
| Bz-5 µM                | 95,925±1,36  | -                                      |
| Bz -2,5 µM             | 85,28±9,80   | -                                      |
| Bz -1,25 µM            | 23,81±0,50   | -                                      |
| Bz -0,625 µM           | 0,01±0,001   | -                                      |
| Al + Bz (500+5 µM)     | 98,2±0,79  | 1,14±0,13                              |
| Al + Bz (500+2,5 µM)   | 94,2±2,02  | 1,60±0,80                              |
| Al + Bz (500+1,25 µM)  | 92,925±0,86  | 1,51±0,33                              |
| Al + Bz (500+ 0,625µM) | 90,03±4,46   | 1,76±0,16                              |
| Al + Bz (100+5 µM)     | 97,65±1,14   | 0,87±0,00                              |
| Al + Bz (100+2,5 µM)   | 93,63±4,97   | 0,73±0,14                              |
| Al + Bz (100+1,25 µM)  | 89,11±5,35   | 0,66±0,07                              |
| Al + Bz (100+ 0,625µM) | 84,53±5,75   | 0,65±0,08                              |
| Al + Bz (10+5 µM)      | 97,39±1,20   | 0,80±0,01                              |
| Al + Bz (10+2,5 µM)    | 84,47±11,18  | 0,76±0,16                              |
| Al + Bz (10+1,25 µM)   | 59,11±28,00  | 0,73±0,30                              |
| Al+ Bz (10+ 0,625µM)   | 36,93±4,99   | 0,62±0,11                              |

Média de dois experimentos independentes. DP: desvio padrão

Esses dados podem ser melhor visualizados nos isobogramas representados na figura 9 e na imagem apresentada na figura 10. O isobograma é a representação gráfica do efeito das combinações. Pode ser observado que para todas as misturas que utilizaram 100 ou 10  $\mu\text{M}$  de alopurinol, os valores do índice de combinação sugeriram um efeito aditivo.



**Figura 9 – Isobograma representativo das interações *in vitro* do alopurinol e benznidazol contra amastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** Os números na abcissa representam os índices de combinação do benznidazol e os na ordenada, do alopurinol, calculados a partir do índice endocítico das monoterapias e das combinações. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes.



**Figura 10:** Atividade do benznidazol e do alopurinol isoladamente ou em combinação sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Fotomicrografias representativas dos efeitos anti-*Trypanosoma cruzi* do benznidazol e alopurinol em monoterapia ou em combinação no tratamento de células H9c2 infectadas pela cepa Y.

A partir dos resultados positivos obtidos nos experimentos *in vitro*, o próximo passo foi avaliar o efeito das combinações de alopurinol e benznidazol em modelo agudo de infecção murina por *T. cruzi*.

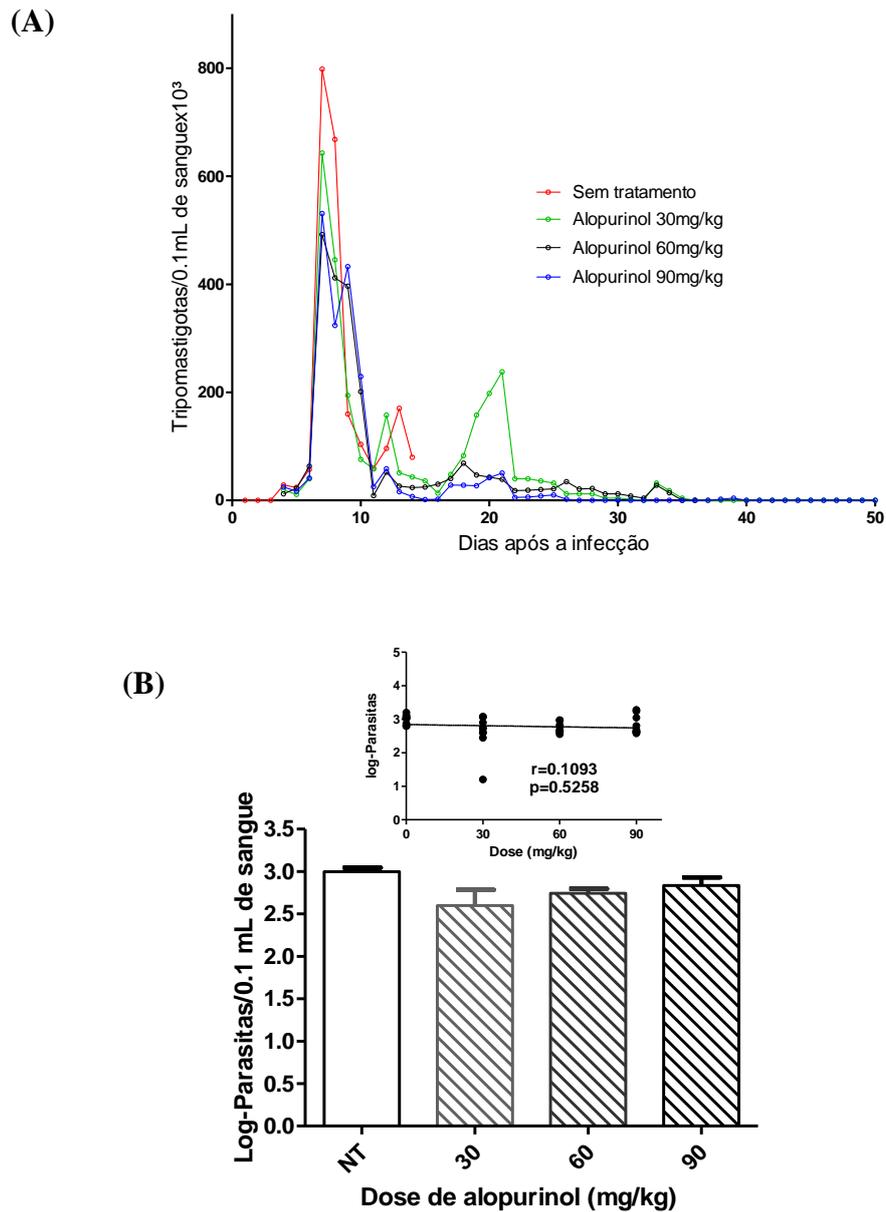
## 5.2. Resultados *in vivo*

Inicialmente foi avaliado o efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol na fase aguda da infecção de camundongos pela cepa Y de *T. cruzi*. Diferentes doses dos fármacos foram administradas em monoterapia por 20 dias consecutivos. Para avaliar a ocorrência de efeito de dose-resposta do tratamento nos níveis de parasitemia e na sobrevivência dos animais, foi realizado o exame de sangue a fresco durante e até 30 dias após o tratamento.

A curva de parasitemia mostrada na figura 11 (A e B) representa os níveis de parasitemia observados nos animais infectados tratados com diferentes doses de alopurinol e controle não tratado. O tratamento com 30, 60 ou 90 mg/kg/dia de alopurinol não foi eficaz em controlar a infecção pela cepa Y, uma vez que durante o

período de tratamento os níveis de parasitemia encontrados nos grupos tratados foram similares aos observados nos animais não tratados.

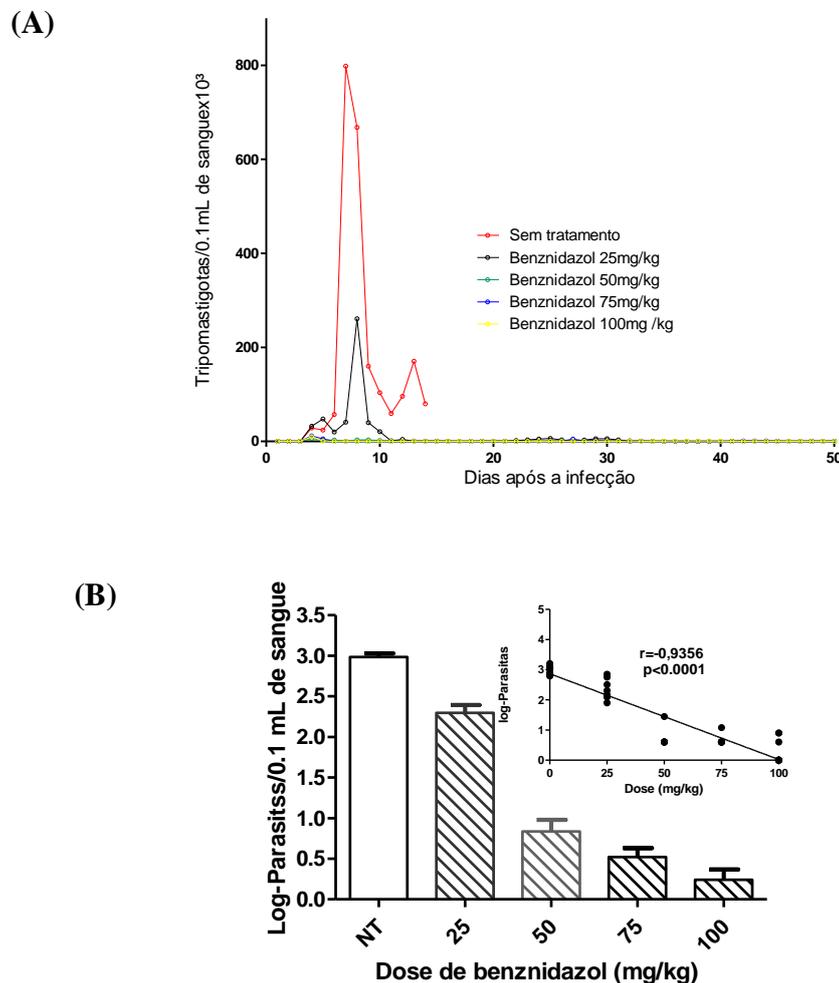
Ainda, a avaliação dos picos máximos de parasitemia (maior valor médio de parasitemia observado durante e até 30 dias após o tratamento) para os grupos tratados com as diferentes doses de alopurinol ou não tratados demonstrou níveis de parasitemia similares para os diferentes grupos (Figura 11B).



**Figura 11: Efeito do tratamento com diferentes doses de alopurinol nos níveis de parasitemia. (A)** Curva de parasitemia detectada no sangue periférico de 10 camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol por 20 dias consecutivos e controle sem tratamento (NT). **(B)** Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico desses animais. O insert representa a análise da correlação (Pearson) entre a dose administrada e a parasitemia.

A incapacidade do alopurinol em controlar a infecção aguda murina pela cepa Y foi acompanhada pelos níveis de mortalidade observados nos grupos de animais tratados com as diferentes doses desse fármaco. No grupo de animais infectados e não tratados observou-se 100% de mortalidade e nos animais tratados com 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol as taxas de mortalidade foram de 90%, 100% e 90%, respectivamente.

De forma diferente, nos animais tratados com as diferentes doses de benznidazol (25, 50, 75 e 100 mg/kg) foi observada uma redução significativa da parasitemia em relação ao grupo controle infectado e não tratado. Adicionalmente foi observado efeito dose-dependente na redução da parasitemia, demonstrada pela análise de correlação de Pearson (Figura 12 A e B).



**Figura12: Efeito do tratamento com diferentes doses de benznidazol nos níveis de parasitemia. (A)** Curva de parasitemia detectada no sangue periférico de 10 camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com 25, 50, 75 e 100 mg/kg de benznidazol por 20 dias consecutivos e controle sem tratamento (NT). **(B)** Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico desses animais. O insert representa a análise da correlação (Pearson) entre a dose administrada e a parasitemia.

O tratamento com benznidazol foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade em todas as doses administradas; enquanto a administração de 50 e 100 mg/kg induziram proteção total contra a mortalidade, nos tratamentos com 25 e 75 mg/kg, essa taxa correspondeu a 10%.

A seguir foi avaliado o efeito do tratamento com a combinação dos fármacos benznidazol e alopurinol na evolução da infecção de camundongos pela cepa Y. Foram utilizadas doses sub-ótimas de benznidazol em combinação com alopurinol a fim de verificar a ocorrência de interação entre esses compostos através da avaliação dos níveis de parasitemia, mortalidade e cura parasitológica. Na Tabela 2 estão mostradas as percentagens de animais que apresentaram a supressão da parasitemia induzida pelo tratamento. Com exceção do grupo que recebeu a combinação de menores doses dos fármacos (25mg de benznidazol associados a 30mg de alopurinol), no qual houve supressão da parasitemia em 80% dos animais, todos os outros grupos apresentaram 100% de exames de sangue a fresco negativos durante o período de tratamento.

**Tabela 2: Percentagem de animais infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* que apresentaram supressão da parasitemia após o tratamento com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol, em monoterapia ou em combinação, e o número de doses necessárias para a indução da negatificação da parasitemia.**

| <i>Fármaco/dose</i> | <i>ESF negativo/total (%) durante o tratamento</i> | <i>Nº de doses</i> |
|---------------------|--|--------------------|
| Al - 30mpk          | 0/10 (0%)  | -                  |
| Al - 60mpk          | 0/10 (0%)  | -                  |
| Al - 90mpk          | 0/10 (0%)  | -                  |
| Bz - 25mpk          | 7/10 (70%)   | 8,43 ± 3,78        |
| Bz - 50mpk          | 10/10 (100%)                                       | 4,10 ± 3,69        |
| Bz - 75mpk          | 9/9(100%)  | 1,44 ± 0,73        |
| Bz - 100mpk         | 10/10 (100%)                                       | 1,29 ± 0,42        |
| Bz/Al -25/30mpk     | 8/10 (80%)   | 13,00 ± 5,12       |
| Bz/Al -25/60mpk     | 10/10 (100%)                                       | 10,30 ± 3,74       |
| Bz/Al - 25/90mpk    | 10/10 (100%)                                       | 6,20 ± 4,20        |
| Bz/Al - 50/30mpk    | 10/10 (100%)                                       | 2,50 ± 0,71        |
| Bz/Al - 50/60mpk    | 10/10 (100%)                                       | 2,00 ± 0,67        |
| Bz/Al - 50/90mpk    | 10/10 (100%)                                       | 4,30 ± 3,71        |
| Bz/Al -75/30mpk     | 9/9 (100%)   | 1,66 ± 0,71        |
| Bz/Al -75/60mpk     | 10/10 (100%)                                       | 2,10 ± 0,32        |
| Bz/Al - 75/90mpk    | 10/10 (100%)                                       | 2,00 ± 0,67        |

ESF – exame de sangue a fresco; Bz – Benznidazol; Al – Allopurinol; mpk – mg por kg de peso

É possível observar também que o número de doses capazes de induzir supressão da parasitemia nos animais tratados com as combinações 75 mg/kg de benznidazol com 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol e 50mg/kg de benznidazol com 30 e 60mg/kg de alopurinol foram próximas ao número de doses necessárias para induzir supressão da parasitemia nos animais tratados com a dose ótima de 100 mg/kg de benznidazol (Tabela 2).

Após o tratamento foi detectada reativação da parasitemia em 100% dos animais tratados com as doses sub-ótimas (25, 50 e 75 mg/kg) de benznidazol em monoterapia.

Os dados relacionados ao tratamento alopurinol em monoterapia não estão apresentados porque nestes animais não foi observada a supressão da parasitemia. Nos animais tratados com os fármacos em combinação, na maior parte das vezes, foi detectada uma percentagem menor de reativação da parasitemia em relação aos animais tratados com as mesmas doses de cada fármaco separadamente. Especialmente no tratamento empregando 75 mg/kg de benznidazol combinados com 30, 60 e 90 mg/kg de alopurinol pode ser observado o benefício da terapia na redução da carga parasitária; enquanto nos animais tratados com 75 mg/kg de benznidazol ou com as diferentes doses de alopurinol foi observado 80% e 100% de reativação da parasitemia, respectivamente, nos camundongos que receberam essas mesmas doses em combinação apresentaram no máximo 11% de reativação da infecção após a imunossupressão (Tabela 3). E a redução na carga parasitária foi acompanhada por aumento da sobrevida nos animais tratados; todas as combinações avaliadas garantiram proteção contra a morte de 80% a 100% para os diferentes grupos (Tabela 3), enquanto os animais infectados e não tratados morreram num prazo de 18 dias.

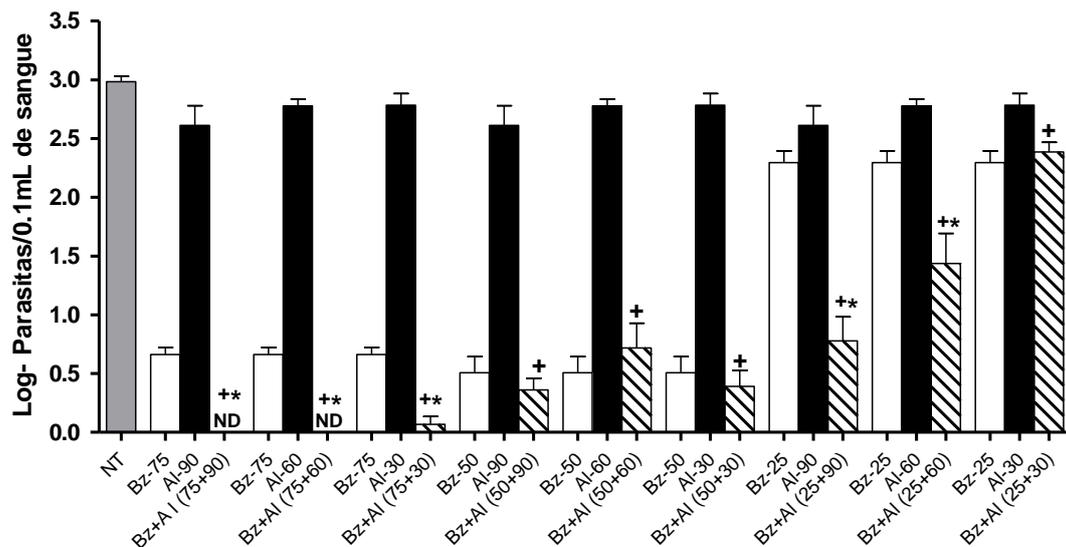
**Tabela 3: Reativação da parasitemia e positividade da PCR de camundongos infectados pela a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol ou alopurinol em monoterapia ou em combinação.**

| <i>Fármaco-Dose em mg/kg</i> | <i>Mortalidade</i> | <i>Reativação da parasitemia</i> |                    | <i>PCR +</i> | <i>Total + (%)</i> |
|------------------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|--------------|--------------------|
|                              |                    | <i>Antes da IS</i>               | <i>Após IS (%)</i> |              |                    |
| Al -30                       | 9/10 (90%)         | -                                | -                  | -            | -                  |
| Al - 60                      | 10/10(100%)        | -                                | -                  | -            | -                  |
| Al - 90                      | 9/10 (90%)         | -                                | -                  | -            | -                  |
| Bz - 25                      | 1/10 (10%)         | 6/10 (100%)                      | 3/3 (100%)         | 9/9 (100%)   | 9/9 (100%)         |
| Bz - 50                      | 0/10 (0%)          | 6/10 (60%)                       | 4/4(100%)          | 10/10 (100%) | 10/10 (100%)       |
| Bz - 75                      | 0/8 (0%)           | 8/10 (80%)                       | 0/2 (0%)           | 8/10 (80%)   | 8/10(80%)          |
| Bz - 100                     | 0/10 (0%)          | 2/10 (20%)                       | 1/8 (12,5%)        | 3/10 (30%)   | 3/10 (30%)         |
| Bz/Al 25/30                  | 2/10 (20%)         | 6/8 (75%)                        | 1/2 (50%)          | 10/10 (100%) | 10/10 (100%)       |
| Bz/Al 25/60                  | 1/10 (10%)         | 5/10 (50%)                       | 3/5 (60%)          | 10/10 (100%) | 10/10 (100%)       |
| Bz/Al 25/90                  | 0/10 (0%)          | 1/10 (10%)                       | 7/9 (77,8%)        | 10/10 (100%) | 10/10 (100%)       |
| Bz/Al 50/30                  | 0/10 (0%)          | 4/10 (40%)                       | 5/6 (83,3%)        | 10/10 (100%) | 10/10 (100%)       |
| Bz/Al 50/60                  | 0/10 (0%)          | 7 /10 (70%)                      | 1/3 (33,3%)        | 8/10 (80%)   | 8/10 (80%)         |
| Bz/Al 50/90                  | 1/10 (10%)         | 4/9 (44,4%)                      | 5/5 (100%)         | 9/9 (100%)   | 9/9 (100%)         |
| Bz/Al 75/30                  | 0/10 (0%)          | 0/9 (0%)                         | 1/9 (11%)          | 4/10 (40%)   | 4/10 (40%)         |
| Bz/Al 75/60                  | 0/10 (0%)          | 0/10 (0%)                        | 0/10 (0%)          | 0/10 (0%)    | 0/10 (0%)          |
| Bz/Al 75/90                  | 0/10 (0%)          | 0/10 (0%)                        | 0/10 (0%)          | 2/10 (20%)   | 2/10 (20%)         |

IS – imunossupressão com ciclofosfamida, mpk – miligramas por quilograma de peso

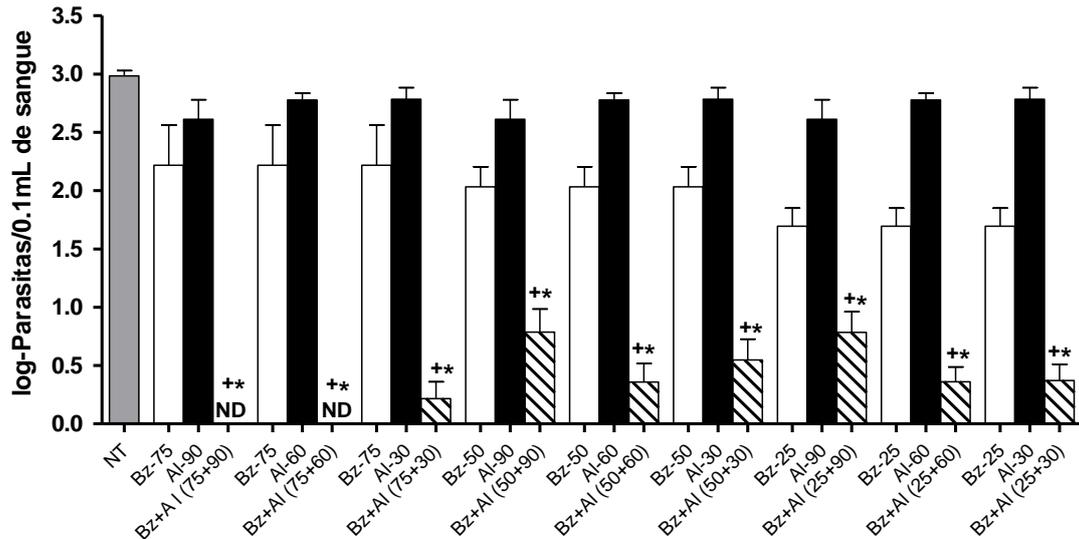
Os resultados de todos os testes utilizados no controle de cura, exame de sangue a fresco antes e após a imunossupressão com ciclofosfamida e PCR em tempo real realizada 30 e 180 dias após o tratamento, estão apresentados na Tabela 3. O alopurinol administrado isoladamente não foi capaz de induzir cura em nenhuma das doses utilizadas. De forma diferente, as doses de 75 mg/kg e 100 mg/kg de benznidazol, quando utilizado em monoterapia, induziram 20% e 70% de cura, respectivamente. O efeito benéfico da combinação foi observado uma vez que as combinações de benznidazol associadas às diferentes doses de alopurinol foram capazes de induzir níveis de cura superiores. Assim, a cura foi detectada em 20% dos camundongos tratados com 50 mg/kg de benznidazol combinada com 60 mg/kg de alopurinol e em 40% dos animais tratados com 75 mg/kg de benznidazol combinada com 30 mg/kg de alopurinol. Níveis de cura superiores àqueles obtidos com o tratamento com a dose ótima de benznidazol (70%) quando administrou-se as combinações 75 mg/kg de benznidazol combinada com 60 mg/kg e 90 mg/kg de alopurinol, sendo de 100% e 80%, respectivamente.

Mesmo na ausência de cura parasitológica, o efeito benéfico da terapia de combinação foi também demonstrado pela redução dos níveis de parasitemia após o tratamento. A figura 13 mostra que a maioria das combinações induziu reduções nos níveis de parasitemia maiores que os medicamentos administrados isoladamente após a reativação natural da parasitemia.



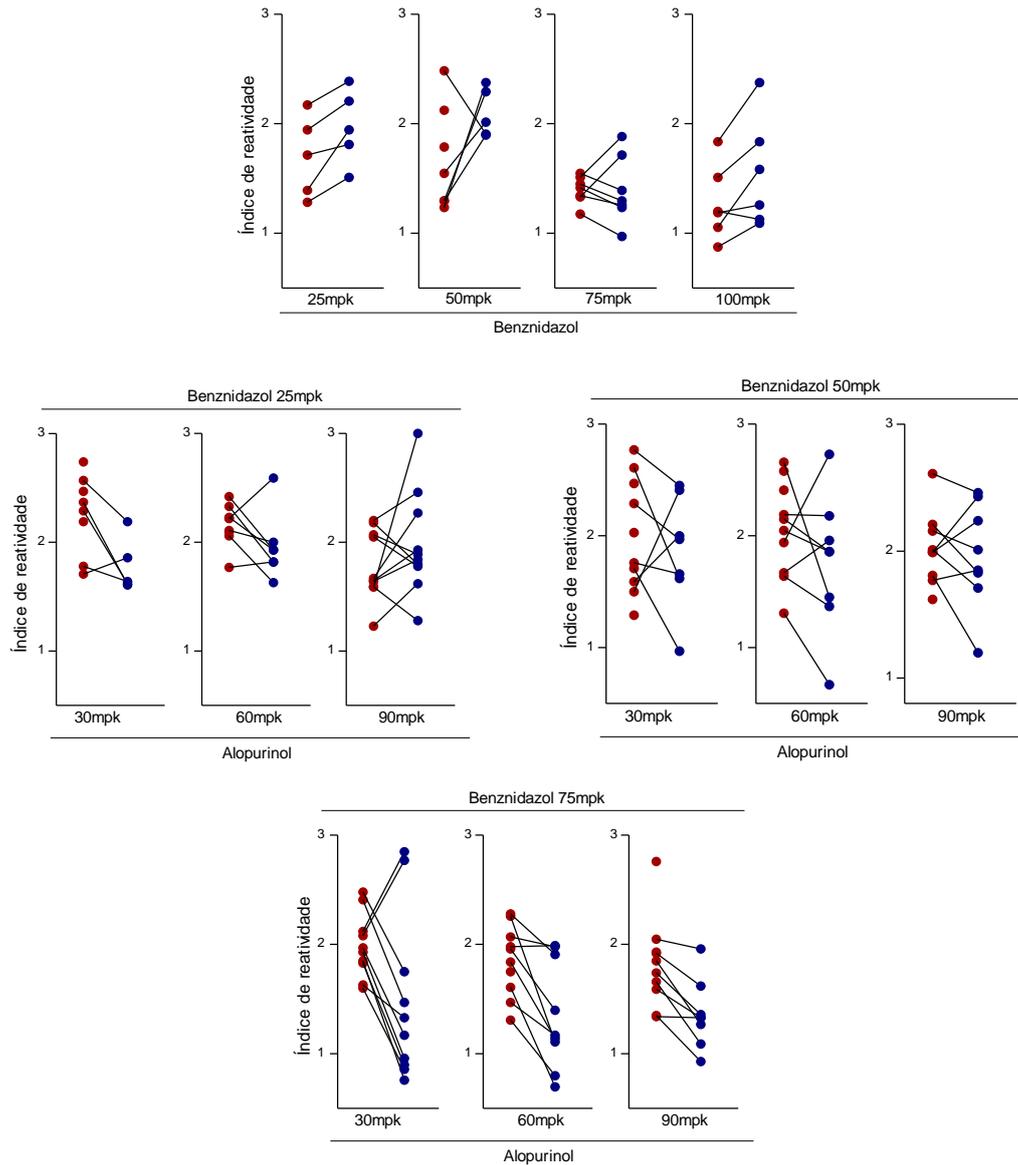
**Figura 13: Efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação na reativação natural da parasitemia.** Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico de animais (n=10) que apresentaram reativação da parasitemia até 30 dias após o tratamento (antes da imunossupressão). Os animais foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol (Bz) ou alopurinol (Al) e com diferentes combinações destes compostos. Barras brancas: monoterapia com benznidazol; Barras pretas: monoterapia com alopurinol, Barras listradas: terapia combinada. +: diferença significativa com monoterapia de Al; \*: diferença significativa com monoterapia com Bz. NT: controle de animais infectados e não tratados. ND: não detectado.

Este mesmo efeito foi observado quando a parasitemia foi quantificada após a imunossupressão com ciclofosfamida. Os níveis de parasitemia detectados nos animais tratados com as diferentes doses de benznidazol e alopurinol combinadas foram sempre significativamente menores do que os níveis de parasitemia detectados nos animais tratados com as mesmas doses em monoterapia, evidenciando a influência da terapia combinada na redução da carga parasitária (Figura 14).



**Figura 14: Efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação na reativação parasitemia após a imunossupressão.** Log do máximo da parasitemia detectada no sangue periférico de animais (n=10) que apresentaram reativação da parasitemia após a imunossupressão com ciclofosfamida realizada 30 dias após o tratamento. Os animais foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol (Bz) ou alopurinol (Al) e com diferentes combinações destes compostos. Barras brancas: monoterapia com benznidazol; Barras pretas: monoterapia com alopurinol; Barras listradas: terapia combinada, +: diferença significativa com monoterapia de Al; \*: diferença significativa com monoterapia com Bz.

A fim de avaliar a influência do tratamento específico na resposta imune humoral, foram realizadas dosagens de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* no soro dos animais no 30° e no 180° dia após o tratamento. Os resultados dessa avaliação foram concordantes com aqueles obtidos na avaliação parasitológica. Nos soros dos animais tratados com a dose ótima de 100 mg/kg de benznidazol os níveis de anticorpos aumentaram com o tempo. O efeito superior da terapia combinada na evolução da infecção por *T. cruzi* também foi demonstrado pela dosagem de anticorpos. Assim os níveis de IgG, em sua maioria, diminuíram ao longo do tempo, mais vez uma isso pôde ser observado principalmente quando doses de 75 mg/kg de benznidazol foram associadas a diferentes doses de benznidazol (Figura 15).



**Figura 15: Efeito do tratamento com alopurinol e benznidazol, isoladamente ou em combinação nos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi*.** Níveis de anticorpos da classe IgG detectados no soro dos animais (30 e 180 dias após o tratamento). Os animais foram inoculados com 5000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes doses de benznidazol (Bz) ou alopurinol (Al) e com diferentes combinações destes compostos.

Os resultados apresentados, avaliados de forma conjunta, mostram que o tratamento com as diferentes doses de benznidazol e alopurinol, administradas em combinação, induzem a uma maior redução da parasitemia em relação às mesmas doses administradas isoladamente. Além disso, foi detectado um maior índice de cura nos animais que receberam 75mg de benznidazol em combinação com as diferentes doses de alopurinol em relação ao tratamento com a dose ótima de benznidazol.

## **6. DISCUSSÃO**

Decorridos mais de cem anos da sua descoberta, a busca por um tratamento seguro e eficaz para a doença de Chagas continua um desafio. Embora muitos avanços tenham sido alcançados, as opções terapêuticas disponíveis continuam sendo o benznidazol e o nifurtimox. Estes compostos, apesar de eficazes no tratamento das fases aguda e crônica recente, são pouco eficazes quando utilizados na fase crônica da infecção, além de apresentarem perfis inadequados de eficácia, segurança e tolerabilidade (Coura & Castro, 2002). Dessa forma, há a necessidade de identificar novos compostos e/ou estratégias terapêuticas que sejam mais eficientes, seguras e acessíveis para o tratamento infecção por *T. cruzi*, particularmente na fase crônica da doença (Urbina *et al.*, 2009).

A busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas foi desestimulada por muito tempo devido à concepção de que apenas fenômenos autoimunes seriam responsáveis pelo desenvolvimento das lesões de fase crônica (Kalil & Cunha Neto, 1996). Essa hipótese tirou de foco o papel do parasito como desencadeador e mantenedor do processo patológico nos tecidos do hospedeiro. Aliada a essa concepção, a falta de interesse por parte das indústrias farmacêuticas pelas enfermidades típicas de países tropicais, estagnou por décadas os avanços na área de quimioterapia da doença de Chagas. Com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis de detecção do parasito, o papel deste na gênese das lesões ganhou novo destaque e, associado ao incentivo de órgãos internacionais para pesquisa de doenças negligenciadas, a procura por novos fármacos com atividade anti-*T. cruzi* voltou a ganhar importância.

Dentre as várias estratégias de busca por novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas, a avaliação racional da atividade anti-*T. cruzi* de fármacos consagrados no tratamento de outras etiologias tem sido amplamente realizada (Gallerano, 1990; Moreira, 1992; Molina *et al.*, 2000; Apt *et al.*, 1998, 2003; Urbina 2009; Bahia *et al.*, 2012; Buckner *et al.*, 2012). No caso de resposta positiva, a utilização desses compostos seria facilitada, por já possuírem perfis toxicológicos e de biodisponibilidade conhecidos em humanos, reduzindo assim o tempo e os custos relacionados com o desenvolvimento farmacológico. Nesse contexto, o efeito do alopurinol, um medicamento utilizado na clínica para o tratamento de hiperuricemia, já foi avaliado experimentalmente e no tratamento de indivíduos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas (Lauria-Pires *et al.*, 1988; Gallerano, 1990; Apt *et al.*, 2003; Gobbi *et al.*, 2007; Rassi, 2007)

No metabolismo de *T. cruzi*, o alopurinol é utilizado pela enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase como um substrato alternativo. Esta enzima pode incorporar o alopurinol ao ácido ribonucleico do parasito, criando um nucleotídeo não funcional, bloqueando, assim, a síntese de novo de purinas, o que afeta a síntese de proteínas e induz a morte do parasito (Marr & Berens, 1978). O alopurinol apresentou atividade no tratamento da infecção murina por *T. cruzi* (Gobbi *et al.*, 2007), porém sua eficácia terapêutica no tratamento de pacientes mostrou resultados contraditórios (Lauria-Pires *et al.*, 1988; Gallerano, 1990; Apt *et al.*, 1998, 2003; Rassi, 2007). Lauria-Pires *et al.* (1988) demonstraram a ineficácia do tratamento com alopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas residentes no Brasil. Este estudo foi confirmado por Rassi *et al.* (2007) que mostrou a ineficácia da intervenção terapêutica com alopurinol em induzir redução dos níveis de parasitemia. Por outro lado, Apt *et al.*, no Chile demonstrou que o tratamento com o alopurinol na fase crônica da doença de Chagas foi eficaz em reduzir as taxas de positividade em xenodiagnóstico e também reduzir ou mesmo prevenir o aparecimento das anormalidades no eletrocardiograma dos pacientes (Apt *et al.*, 1998, 2003). A variabilidade na eficácia do tratamento com alopurinol nestes estudos, realizados em diferentes áreas geográficas, poderia ser relacionada, pelo menos parcialmente, às diferenças entre as populações de *T. cruzi* presente em cada região.

Considerando os diversos estudos que mostram a atividade anti-*T. cruzi* do alopurinol, e a necessidade de aumentar a eficácia do tratamento de referência com benznidazol, neste estudo foi avaliado o efeito do tratamento combinado destes compostos *in vitro* e na infecção de camundongos pela cepa Y de *T. cruzi*.

Para a avaliação inicial, foram realizados experimentos *in vitro*, na tentativa de identificar a natureza da interação entre o alopurinol e o benznidazol. Assim, foi verificado que o alopurinol, na concentração de 500  $\mu$ M induz uma redução de 90% da infecção de células H9C2, quando considerado o índice endocítico (% de células infectadas x o número de amastigotas/célula infectadas). Interessantemente, a incubação destas células com alopurinol (independente da concentração) não foi eficaz em reduzir o número de células infectadas em relação às culturas controle. Estes resultados mostram que o alopurinol interfere na multiplicação do parasito, mas não na taxa de infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*. Em outras palavras, o efeito observado seria tripanostático e não tripanocida. Da mesma forma, Ávila & Ávila

(1981) demonstraram o efeito tripanostático do alopurinol sobre formas epimastigotas de diferentes cepas, inclusive a cepa Y.

Resultados diferentes foram observados por Nakajima-Shimada (1996), que demonstrou a eficácia do alopurinol em reduzir, de forma dose-dependente, o número de fibroblastos infectados pela cepa Tulahuen (sensível ao benznidazol), bem como o número de amastigotas por células, encontrando um IC<sub>50</sub> de 3 µM. As diferenças nestes resultados poderiam estar relacionadas tanto às cepas do parasito utilizadas, como às condições dos ensaios, uma vez que no trabalho citado a incubação com o fármaco foi realizada imediatamente após a infecção das células hospedeiras, enquanto no presente trabalho após 24 horas de infecção. A hipótese de que o efeito do alopurinol é principalmente observado na multiplicação do parasito é corroborada pela ausência de efeito tripanocida sobre as formas tripomastigotas (Nakajima-Shimada, 1996).

Por outro lado, nossos resultados mostraram que o benznidazol apresenta uma potente atividade tripanocida *in vitro*, notadamente dose-dependente, como mostrada na figura 7

A seguir, foi avaliado o efeito da combinação de alopurinol e benznidazol, *in vitro*, utilizando células H9C2 infectadas pela cepa Y. Para esta avaliação foi utilizado o método de diluição de “tabuleiro de damas” previamente utilizado em diferentes estudos de combinação de fármacos *in vitro* (Urbina *et al.*, 1988; Lazard *et al.*, 1990; Urbina *et al.*, 1993; Santa Rita *et al.*, 2005; Benaim *et al.*, 2006). Quando diferentes fármacos são utilizados em combinação, três desfechos podem ser esperados: sinergismo, aditividade ou antagonismo. Sinergismo resulta da interação positiva entre os compostos; nesse caso o efeito com a utilização da combinação é superior ao obtido para cada fármaco isoladamente. A ausência de interação é referida como efeito aditivo; o efeito da combinação é semelhante ao observado com a utilização das drogas em monoterapia. Já nas interações antagônicas, a mistura dos compostos resulta em efeito menor que o esperado (Chou, 1984, 2006).

Para estimar a natureza da interação entre alopurinol e benznidazol foi utilizado o índice de combinação, que avalia o efeito de cada fármaco proporcionalmente na combinação. A classificação do índice de combinação foi feita de acordo com Seifert *et al.* (2006). Segundo essa classificação, se o índice de combinação for menor que 0,5 corresponde a uma interação sinérgica, quando compreender o intervalo de 0,5 até 4 indica efeito aditivo e se for superior a 4 corresponde a uma interação antagônica. Os resultados permitiram concluir que há um efeito aditivo resultante da utilização de

benznidazol e alopurinol em combinação sobre a infecção *in vitro* pela cepa Y, uma vez que em todas as concentrações avaliadas, foram observados índices de combinação variando entre 0,62 e 1,76.

Considerando os resultados promissores dos experimentos *in vitro*, na etapa seguinte deste estudo foi avaliada o efeito desta combinação de fármacos no tratamento de camundongos infectados pelo cepa Y de *T. cruzi*. As diferentes doses de benznidazol e alopurinol utilizadas neste estudo foram escolhidas de acordo com dados da literatura. Para o alopurinol, inicialmente, foi testada a dose de 15mg/kg considerada eficaz em controlar a infecção murina aguda (Gobbi *et al.*, 2007), porém, esta dose não foi capaz de induzir redução os níveis de parasitemia induzida pela cepa Y em camundongos Swiss (dados não mostrados). Dessa forma, doses superiores foram avaliadas (30, 60 e 90 mg/kg) na tentativa de identificar o efeito do alopurinol nesse modelo de estudo. Para o benznidazol, considerando que o tratamento de referência é de 100mg/kg (Filardi e Brener, 1987), foram utilizadas as doses de 25, 50, 75 e 100 mg/kg para os experimentos de monoterapia e as doses subótimas (25, 50, 75 mg/kg), para os experimentos de combinação, considerando que estas doses não induzem índices de cura importantes quando administradas isoladamente (Tabela 3).

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que as diferentes doses de alopurinol não foram capazes de reduzir a parasitemia, nem a taxa de mortalidade de camundongos infectados pela cepa Y, nos esquemas terapêuticos utilizados neste estudo. Esses resultados não são concordantes com outros autores; Ávila & Ávila, (1981) utilizando modelo murino de infecção aguda observaram que doses de 32 e 64 mg/kg administradas por via intraperitoneal durante 10 dias foram eficazes em reduzir os níveis de parasitemia e a taxa de mortalidade. Ainda, Gobbi *et al* (2007) demonstraram que o tratamento de camundongos infectados pela cepa Tulahuen com 15 mg/kg de alopurinol por via oral durante 90 dias foi eficaz em reduzir significativamente a parasitemia . Estas diferenças podem ser relacionadas às diferenças metodológicas entre os dois estudos, tanto em relação às cepas utilizadas, como aos esquemas terapêuticos, especialmente considerando o tempo de tratamento.

De forma diferente, os tratamentos realizados com benznidazol foram capazes de induzir redução da parasitemia de forma dose-dependente e também a mortalidade dos animais. No entanto, após o tratamento, foi detectada a reativação da parasitemia e/ou resultado positivo na PCR em 20% dos animais tratados com 100 mg/kg, em 80% dos

animais que receberam 75 mg/kg e em 100% dos tratados com 25 ou 50 mg/kg de benznidazol.

Posteriormente, avaliou-se o efeito do tratamento do benznidazol associado ao alopurinol. Para isso, doses sub-ótimas do benznidazol, ou seja, doses que não foram capazes de induzir cura, foram associadas a diferentes doses de alopurinol.

O efeito benéfico do tratamento em combinação foi verificado inicialmente pela redução do número de doses necessárias para a supressão da parasitemia, quando comparadas com as mesmas doses de cada fármaco administradas em monoterapia. Adicionalmente, foi observada uma redução significativa da taxa de mortalidade nos animais tratados com as combinações de fármacos, taxa esta comparável com a observada no tratamento com a dose ótima de benznidazol (Tabela 3).

O efeito benéfico da combinação foi verificado, também, pela redução da parasitemia nos casos de falha terapêutica, especialmente notada após a imunossupressão com ciclofosfamida. Os níveis de parasitemia detectados no sangue dos camundongos que receberam as diferentes combinações foram significativamente menores quando comparados aos animais que receberam as mesmas doses dos fármacos em monoterapia.

Quando foram avaliados todos os ensaios realizados para a definição da cura parasitológica (exame de sangue a fresco, antes e após imunossupressão e PCR), ficou bastante evidente a eficácia da terapia combinada. Foi observada 20% de cura entre os animais tratados com benznidazol/alopurinol (50/60 mg/kg), enquanto não foi detectada cura entre os animais tratados com as mesmas doses em monoterapia. Este efeito foi notado especialmente quando foram combinadas as doses de 75 mg/kg de benznidazol com 60 mg/kg de alopurinol, onde foi observado 100% de cura, enquanto o benznidazol nesta dose em monoterapia induziu 20% de cura e o alopurinol, nessas doses, não foi eficaz em curar nenhum animal.

Os resultados das dosagens de anticorpos da classe IgG são concordantes com os outros ensaios realizados no controle de cura. De modo geral, a negativação e/ou a redução do parasitismo sanguíneo correspondeu também a uma redução nos níveis de anticorpos da classe IgG no plasma dos animais, reforçando a eficácia da terapia combinada. De acordo com Cançado (1963, 1997), juntamente à negativação dos testes parasitológicos, os baixos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* podem indicar sucesso terapêutico. De forma semelhante, Garcia *et al.* (2005) demonstraram uma redução dos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro de camundongos tratados com Bz.

Adicionalmente, estudos que avaliam a resposta imune humoral mostram que anticorpos da classe IgG, produzidos no início da fase aguda da infecção, reagem principalmente com moléculas de superfície das formas tripomastigotas, exercendo um papel importante no controle da parasitemia e na resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Kretzli e Brener, 1976).

Considerando os resultados de todos os parâmetros avaliados neste estudo, ou seja, o efeito do tratamento na supressão e/ou redução da parasitemia, na taxa de mortalidade, nos níveis de parasitemia nos casos de falha terapêutica, nos níveis de anticorpos da classe IgG e nos índices de cura, fica clara a interação positiva entre os dois compostos avaliados em combinação, especialmente considerando que em algumas combinações foram observadas 60% a 100% de cura, enquanto nas monoterapias o índice máximo detectado foi 20%. Estes resultados, também, mostram uma boa correlação entre os resultados dos ensaios *in vitro*, nos quais a natureza da interação entre os dois compostos foi classificada como aditiva, com os resultados *in vivo*, apesar de ser difícil classificar a natureza da interação entre dois compostos quando administrados *in vivo*.

Considerando as interações possíveis em decorrência da utilização de diferentes compostos em combinação, é claro o benefício de uma interação sinérgica e o prejuízo de uma interação antagônica. Por outro lado, o efeito aditivo é benéfico, uma vez que pode resultar em aumento da eficácia terapêutica, desde que não sejam utilizadas doses que induzam toxicidade para o hospedeiro (Jia, 2006). O efeito aditivo observado com a utilização combinada de alopurinol e benznidazol pode ser relacionado ao mecanismo de ação diferenciado de ambos os fármacos sobre o parasito. Apesar de não apresentar ação letal direta contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o alopurinol apresenta ação tripanostática, no caso, interferindo na proliferação das formas intracelulares do parasito. Esse efeito provavelmente induziu uma potenciação do efeito do benznidazol, possibilitando a utilização de doses 25% menores desse fármaco e ainda garantindo índices de cura similares ou superiores ao tratamento com a dose padrão.

O efeito da combinação de fármacos no tratamento da infecção por *T. cruzi* tem sido extensivamente pesquisado, mostrando ser uma alternativa viável, a curto prazo, na tentativa de melhorar a eficácia do tratamento dessa enfermidade. Além disso, essa estratégia pode possibilitar a redução nas doses dos fármacos e/ou na duração do tratamento, o que poderia contribuir para a redução de efeitos tóxicos. Nessa perspectiva, muitos estudos foram realizados na infecção experimental utilizando combinação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação. A combinação do

benznidazol, um nitro-heterocíclico, com o posaconazol (um inibidor da síntese de ergosterol) foi eficaz em induzir cura em camundongos infectados pela cepa Tulahuen administrando-se o tratamento durante um período menor (Cencig *et al.*, 2012). Além disso, Diniz *et al.* (2013) demonstraram que o tratamento utilizando esses mesmos compostos é eficaz em induzir cura também quando utilizadas doses sub-ótimas do benznidazol e posaconazol em combinação na infecção aguda de camundongos pela cepa Y de *T. cruzi*. Este tratamento de combinação induziu índices de cura maiores do que os efeitos observados quando os fármacos foram administrados isoladamente nas mesmas doses, o que indica uma interação positiva entre os dois compostos e a possibilidade de redução da dose de cada composto (Diniz *et al.*, 2013).

Outros estudos têm demonstrado os benefícios da terapia de combinação de fármacos no tratamento da infecção por *T. cruzi*, mesmo na ausência de cura parasitológica. A associação de fármacos pode contribuir para a redução da carga parasitária, da mortalidade e interferir na evolução das lesões teciduais associadas ao parasitismo. Grosso *et al.* (2013) demonstraram os efeitos da terapia de combinação do benznidazol e alopurinol em doses sub-ótimas em vários esquemas de tratamento das fases aguda e crônica da infecção experimental. Quando o alopurinol foi administrado imediatamente após o tratamento benznidazol foi observada redução da carga parasitária, com conseqüente diminuição do infiltrado inflamatório no músculo cardíaco e também dos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi*.

Nesse sentido, Perez- Mazliah (2012) observaram o melhor efeito do tratamento quando o benznidazol foi administrado logo após alopurinol para pacientes argentinos na fase crônica da doença de Chagas. Os resultados mostraram que as alterações imunológicas decorrentes deste tratamento seriam um indicativo de redução de parasitismo tecidual, mesmo não sendo detectada soroconversão nos pacientes avaliados.

Estes resultados confirmam a importância de identificar entre os compostos já comercializados, aqueles que em combinação com medicamentos já utilizados na terapia da doença de Chagas possam apresentar um efeito benéfico. Essa estratégia pode ajudar a evitar os gastos financeiros e o tempo consumido em pesquisas direcionadas à toxicidade e à biodisponibilidade de fármacos. Além de ser uma valiosa alternativa para melhoria da eficácia terapêutica, reduzindo a toxicidade e o potencial desenvolvimento de resistência a drogas (Vivas *et al.* 2008, Chung *et al.*, 1985). Considerando que vários estudos já têm demonstrado as limitações do benznidazol no tratamento da doença de

Chagas, nossos resultados sugerem o uso da associação do benznidazol e alopurinol em ensaios clínicos. Adicionalmente, estes resultados indicam a importância de avaliar a terapia combinada utilizando o benznidazol e outros compostos, inclusive aqueles que atuam na via salvação de purinas.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados dos experimentos *in vitro* permitiram identificar um efeito tripanostático decorrente da utilização do alopurinol e confirmaram o efeito tripanocida do benznidazol na infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*. Já a combinação destes fármacos revelou um efeito aditivo sobre a inibição da infecção;

Os resultados das avaliações *in vitro* foram confirmados pelos experimentos realizados em modelo murinho de infecção pela cepa Y. Todas as doses de benznidazol administradas em monoterapia apresentaram efeito de redução da parasitemia de forma dose-dependente; já as diferentes doses de alopurinol, quando administradas isoladamente, não foram capazes de interferir na evolução da infecção.

O alopurinol potenciou a atividade do benznidazol no tratamento da infecção aguda murina, possibilitando redução de 25% na dose do fármaco de referência, com manutenção de efeito terapêutico similar ou superior ao observado em decorrência do tratamento padrão.

Os resultados positivos obtidos com a terapia combinação entre o benznidazol e o alopurinol *in vitro* e *in vivo* a credencia para ser testada em pacientes com a doença de Chagas e confirmam também que a associação de fármacos pode ser uma alternativa na abordagem terapêutica desses pacientes.

## **8. REFERÊNCIAS**

- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.JR; WALSH, J.E. *A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay.* J Immunol Metho 170,211–224, 1994.
- ALTCLAS, J.; SINAGRA, A.; DICTAR, M.; LUNA, C.; VERÓN, M.T.; DE RISSIO, A. M.; GARCÍA, M. M.; SALGUEIRA, C.; RIARTE, A. *Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy.* Bone marrow transplantation, v.36, p.123-129, 2005.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. *The trypanosoma cruzi- host cell interplay: location, invasion, retention.* Nature Reviews Microbiology, v. 3, p.819-823, 2005.
- APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTÉS, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. *Treatment of chronic disease with Itraconazole and Allopurinol.* Am J Trop Med Hyp, 59 (1) pp. 133-138, 1998.
- APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SANCHEZ, G.; VARGAS, S. L.; RODRIGUEZ, J. *Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up.* Ann Trop Med Parasitol 97:23-9, 2003.
- ARAÚJO, M.S.S; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.S.; BRENER, Z. *A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 45:819-824, 2000.
- ÁVILA, H.A.; GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.C.; SIMPSON, L. *Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences.* Mol. Biochem. Parasitol. 42:175–188, 1990.
- BAHIA, M.T.; ANDRADE, I.M.; MARTINS, T.A.F.; NASCIMENTO, A.F.D.S.; DINIZ, L.F. *et al. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease.* PLoS Negl Trop Dis 6(11), 2012.

BARRET M.P. BURCHMORE R.J., STICH A., LAZZARI J.O., FRASCH A.C., CAZZULOJ.J., KRISHNA S. *The tripanosomiasis*. Lancet, 362, p. 1469-1480, 2003.

BENAIM, G.; SANDERS, J.M.; GARCIA-MARCHÁM, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDEIRA, A.R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J.M.; LEON-ROSSEL, A.; CONCEPCION, J.L.; SCHIJMAN, A.G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. *Amidarone has intrinsic anti-Trypanosoma cruzi activity and acts synergistically with posaconazole*. J. Med. Chem. 49:892-899, 2006.

BLAU, L.; MENEGON, R. F.; TROSSINI, G. H.G.; DUTRA MOLINO, J. V.; VITAL, D. G.; BARRETTO CICARELLI, R. M.; PASSERINI, G. D.; BOSQUESI, P. L.; CHIN, C. M. *Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates*. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 67, p. 142-151, 2013.

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

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

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

BRENER, Z. *Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 4: 389-396, 1962.

BUCKNER, F.S.; BAHIA, M.T.; SURYADEVARA, P.K.; WHITE, K.L.; SHACKLEFORD, D.M.; CHENNAMANENI, N.K. *et al. Pharmacological characterization, structural studies, and in vivo activity of anti-chagas disease lead compounds derived from tipifarnib*. Antimicrob Agents Chemother. 56(9): 4914-21, 2012.

CALABRESE, K.S. *Immunosuppressive drugs as a tool to explore immunopathology in experimental Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(Suppl 1):273-276, 1999.

- CALDAS S., SANTOS F.M., DE L.M., DINIZ L.F., MACHADO-COELHO G.L., VELOSO V.M. & BAHIA M.T. *Trypanosoma cruzi*: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. *Exp. Parasitol.* 118, 315-323, 2008.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.44, n.1, p. 29-37, 2002.
- CENCIG, S.; COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*. Dec; 40(6):527-32, 2012.
- CHAGAS, C. Nova Tripanozomíase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159 – 218, 1909.
- CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 309-310, 1999.
- CHOU, T.C. & TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*.22:27–55, 1984.
- CHOU, T.C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*.Vol. 58, 3, 623-574, 2006.
- COURA, J.R.; ANUNZIATO, N. & WILLCOX, H.P. Chagas disease morbidity. I. Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78: 363-372, 1983.
- COURA, J.R.; ABREU, L.L.; BORGES-PEREIRA, J.; WILCOX, H.P. Morbidade da doença de Chagas. IV – Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80(1): 73 – 80, 1985.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 97, nº1. Rio de Janeiro, Jan 2002.

- CUMMINGS K.L. & TARLETON R.L. *Rapid quantitation of Trypanosoma cruzi in host tissue by real-time PCR*. Mol. Biochem. Parasitol. 129, 53-59, 2003.
- DASTGHEIB, L.; NASERI, M.; MIRASHE, Z. *Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial*. Int J Dermatol. Dec;51(12):1508-11, 2012.
- DIAS, L. C. & DESSOY, M. A. *Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs*. Quim.Nova 32(9), 2444-2457, 2009.
- DIAS J.C. *Epidemiology of Chagas disease*. Em: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.S., Rassi, A. (eds), *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT Brasil. São Paulo 49-80, 1992.
- DIAS, J. C. P. *Notas sobre o Trypanosoma cruzi e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39, n. 4, p.370-375, 2006.
- DINIZ, L.F.; URBINA, J.A.; DE ANDRADE, I.M.; MAZZETI, A.L.; MARTINS, T.A.F. *Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments*. PLoS Negl Trop Dis 7(8): e2367, 2013
- DOCAMPO, R. *Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs*. Chem.Biol.Interact. 73, 1-27, 1990.
- ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. *Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection*. J. Exp. Med., v,188, p. 725-734, 1998.
- FERREIRA, H.O. *Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 23:209-211, 1990.
- FILARDI, L.S.; BRENER, Z. *Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease*. Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81:755-759, 1987.

- FIELDS, R.D. & LANCASTER, M.V. *Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity*. Am Biotechnol Lab 11,48– 50, 1993.
- FIVELMAN, Q.L.; ADAGU, I.S.; WARHUST, C.W. *Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying in vitro Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.48 (11), 4097–4102, 2004.
- GALLERANO, R.H.; MARR, J.J.; SOSA, R.R. *Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease*. Am J Trop Med Hyg. Aug; 43(2): 159-66, 1990.
- GARCIA, E. S.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. *Biological factors involving Trypanosoma cruzi life cycle in the invertebrate vector, Rhodnius prolixus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, suppl. 1, p. 213-216, 1999.
- GOBBI, P. *et al. Allopurinol is effective to modify the evolution of Trypanosoma cruzi infection in mice*. Parasitol Res 1001: 1459-1462, 2007.
- GROSSO, N.L.; ALARCON, M.L.; BUA, J.; LAUCELLA, S.A.; RIARTE, A.; FICHERA, L.E. *Combined treatment with benznidazole and allopurinol in mice infected with a virulent Trypanosoma cruzi isolate from Nicaragua*. Parasitology. Sep;140 (10):1225-33, 2013
- HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. *Correlation between T. cruzi parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings*. Cardiovasc Pathol 2: 101-106, 1993a.
- HIGUCHI, M.L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D. *Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process*. Virchows Arch A Pathol Anat 423: 157-160, 1993b.
- HWANG, J.; BITARAKWATE, E.; PAI, M.; REINGOLD, A.; ROSENTHAL, P.J.; DORSEY, G. *Chloroquine or amodiaquine combined with sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated malaria: a systematic review*. Trop Med Int Health. Jun;11(6):789-99, 2006.

INIGUES, E.; SÁNCHEZ, A.; VASQUEZ, M.A. *et al.* *Metal–drug synergy: new ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against Leishmania major and Trypanosoma cruzi and nontoxic to human or murine normal cells.* *Journal of Biological Inorganic Chemistry* October, V. 18, Issue 7, pp 779-790, 2013

JIA, J. *et al.* *Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives.* *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 111-128, 2009

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; McCURLEY, T.L. *Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy.* *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-357, 1993

LAMAS, M.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMON, C. J. *Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole.* *International Journal of Pharmaceutics*, v.307, n.2, p.239-243, 2006.

LANA, M, LOPES, LA, MARTINS, HR, BAHIA, MT, MACHADO-DE-ASSIS, GF, WENDLING, AP, MARTINS-FILHO, AO, MONTOYA, RA, DIAS, JCP, ALBAJAR-VIÑAS, P. *Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment.* *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 104(8): 1139-1147, December 2009

LAURIA-PIRES, L.; CASTRO,C.N.;EMANUEL, A.; PRATA, A. *Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase Chagas of Chagas disease.* *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21:79-0, 1988.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D.L.; TEIXEIRA, A.R.L. *Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63:111–118, 2000.

LAZARDI, K.; URBINA, J.A.; SOUZA., W. *Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*34:2097–2105, 1990.

- LEON, J.S.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. *Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease*. Journal of Immunology 171, 4271-7, 2003.
- LEONARDI, D.; SALOMÓN, C. J.; LAMAS, M. C.; OLIVIERI, A. C. *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.140-147, 2009.
- MALDONADO, R.A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J.A. *Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.37:1353–1359, 1993.
- MARR, J.J.; BERENS, R.L. *Antitrypanosomal Effect of Allopurinol: Conversion in vivo to Aminopyrazolopyrimidine Nucleotides by Trypanosoma cruzi*. Science, vol.201, 15 september, 1978
- MS. Ministério da Saúde. Balanço das Ações da Saúde. p.85, 2003
- MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J.A. *Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts*. Antimicrob.Agents Chemother. 44, 150-155, 2000.
- MONCAYO, A. *Progress towards interruption of transmission of Chagas disease*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94 (Supl. D): 401 – 404, 1999.
- MORENO M., D'AVILA D.A., SILVA M.N., GALVAO L.M., MACEDO A.M., CHIARI E., GONTIJO E.D. & ZINGALES B. *Trypanosoma cruzi benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease*. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 105, 918-924, 2010.
- MOSER D.R., KIRCHHOFF L.V. & DONELSON J.E. *Detection of Trypanosoma cruzi by DNA amplification using the polymerase chain reaction*. J.Clin.Microbiol. 27, 1477-1482, 1989.

- NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. *Inhibition of Trypanosoma cruzi Growth in Mammalian Cells by Purine and Pyrimidine Analogs*. Antimicrob Agents Chemother. November; 40(11): 2455–2458, 1996
- NUNES, M.C.P.; DO CARMOS, A.A.L.; ROCHA, M.O.C.; RIBEIRO, A.L.R. *Mortality prediction in Chagas heart disease*. Expert Review of Cardiovascular Therapy. 10(9):1173-84, 2012.
- NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J. *Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil*. Emerging Infectious Diseases, v. 15, n. 4, p. 653-655, 2009.
- PEDRIQUE, B. *et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment*. Lancet, Out. 2013
- PEREIRA, J.B.; WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. *Morbidity in Chagas disease. III. Longitudinal study of 6 years, in Virgem da Lapa, MG, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Jan-Mar; 80(1):63-71, 1985.
- PEREZ-MAZLIAH, D.E.; ALVAREZ, M.G.; COOLEY, G.; LOCOCO, B. E.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALBAREDA, M.C.; ARMENTI, A.H.; TARLETON, R.L.; LAUCELLA, S.A.; VIOTTI, R. *Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of Trypanosoma cruzi infection: a pilot study*. JAntimicrob Chemother. Feb; 68(2):424-37, 2012.
- RASSI, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI JR, A.; RASSI, G.G.; RASSI, S.G.; IG, D.A. S.; RASSI, A.G. *Specific treatment for Trypanosoma cruzi: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease*. Am J Trop Med Hyg 76:58-61, 2007.
- RASSI JUNIOR, A., RASSI, A., *et al.* Chagas Disease. Lancet 375(1388): 402, 2010
- RAVIOLO, M.A; SOLANA, M.E.; NOVOA, M.M.; ALBA-SOTO, C.D.; BRINÓN, M.C. *Synthesis, physicochemical properties of allopurinol derivatives and their biological activity against Trypanosoma cruzi*. European Journal of Medicinal Chemistry, 69: 455-464, 2013
- REMME, J.H.F.; FEENSTRA, P.; LEVER, P.R.; MEDICI, A.C.; MOREL, C.M.; NOMA, M.; RAMAIAH, K.D.; RICHARDS, F.; SEKETELI, A.; SHMINIS, VAN

- BRAKEL, W.H. E VASSAL, A. *Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis and leprosy*. Disease Control Priorities in Developing Countries, v. 22, p. 433-447, 2006.
- REZENDE, J.M; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de chaga. Em BRENNER Z., ANDRADE Z.A, BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de chagas*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. P, 297-342
- ROMAND, S.; PUDNEY, M.; DEROUIN, F. *In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother. Nov;37(11):2371-8, 1993.
- ROMANHA, A. J. *et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.105. n.2, Mar, 2010.
- SCHMUNIS, G. A. *Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America*. Mem Inst Oswaldo Cruz; 94 (Supl I): 93–101, 1999.
- SCHMUNIS, G. A. *Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 102 (Supl. I): 75-85, 2007.
- SCHOFIELD, C.J. & GALVÃO, C. *Classification, evolution, and species groups within the Triatominae*. Acta Trop. May-Jun;110(2-3):88-100, 2009
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. *Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco*. Folia Clin Biol 20, 191-203, 1953.
- SILVA, J.J.N.; GUEDES, P.M.M. *et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity*. British Journal of Pharmacology 160, 260–269, 2010.
- SEIFERT, K.; CROFT, S.L. *In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Jan. p. 73–79, 2006

- SEIFERT, K.; MUNDAY, J.; SYEDA, T.; CROFT, S.L. *In vitro interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* Apr;66(4):850-4, 2011.
- SOEIRO, M.N.C.; WERBOVETZ, K.; BOYKIN, D.W.; WILSON, W.D.; WANG, M.Z.; HEMPHILL, A. *Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review*. *Parasitology* 140: 929-951, 2013.
- STOPPANI, A.O.M. *Quimioterapia de la enfermedad de Chagas*. *Medicina* 59: 147-165, 1999.
- STORDEUR P., POULIN L.F., CRACIUN L., ZHOU L., SCHANDENE L., DE L.A., GORIELY S. & GOLDMAN M. *Cytokine mRNA quantification by real-time PCR*. *J.Immunol.Methods* 259, 55-64, 2002.
- SUASNÁBAR, F.; ARIAS, E.; STREIGER, M. *Evolutionary behaviour towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 42:99–109, 2000.
- TARLETON, R.L. *Parasite persistence in the aetiology of Chagas Disease*. *International Journal of Parasitology*.31(2001)550-554, 2001.
- TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; LOZZI S. P.; HECHT M. M.; ROSA A. C.; MONTEIRO, P. S. *Environment, interactions between Trypanosoma cruzi and its host, and health*. *Cadernos Saúde Pública*, v. 25, suppl.1, p. S32-S44, 2009.
- TORRICO, F.; ALONSO-VEJA, C.; SUAREZ, E. *Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia*. *Am J Trop Med Hyg*; 70: 201–09, 2004.
- URBINA, J.A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L.M.; LIENDO.A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG, D. *Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: In Vitro and In Vivo Studies*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Julho, p. 1771–1777,1998.

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

URBINA, J.A. *Product Development (Preclinical And Clinical) Research Of New Therapeutic Tools For The Specific Treatment Of Chagas Disease*. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases and the Pan American Health Organization (PAHO). Buenos Aires, Argentina, 17-20 April, 2007.

URBINA J.A. *Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease*. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 104 Suppl 1, 311-318, 2009.

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

VIOTTI, R., VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M. E ARMENTI, A. *Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial*. Ann. Int. Med., v. 144(10), p. 724–734, 2006.

VIVAS, L.; RATTRAY, L.; STEWART, E.; BONGARD, B.L.; ROBINSON, W.; PETERS; CROFT, S.L. *Anti-malarial efficacy of pyronaride and artesunate in combination in vitro and in vivo*. Acta Tropica. 105:222-228, 2008

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. *Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice*. Bull World Health Organ. 53:55–65, 1976.

WILKINSON, S. R. & KELLY, J. M. *Trypanocidal drugs: mechanisms resistance and new targets*. Expert reviews in molecular medicine. Vol 11, 2009.

WHO. World Health Organization. *Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee*. Technical Report Series, n. 905, p.1-109, 2002.

WHO. World Health Organization. *First. Report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*. Genebra, 2010.

WHO. World Health Organization. *Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340*. Updated March, 2013.

ZINGALES, B.; SG ANDRADE, M.R.S.; BRIONES, D.A.; CAMPBELL, CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUH, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 1051-1054, 2009.*