



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CBIOL



**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL, ITRACONAZOL E
SUA ASSOCIAÇÃO NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL NO MODELO CÃO**

Aluna: Eleonora Lima Alves Cunha

Orientador: Marta de Lana

**LABORATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS
(LADOC)**

Ouro Preto – MG

2017

ELEONORA LIMA ALVES CUNHA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL,
ITRACONAZOL E SUA ASSOCIAÇÃO NA FASE AGUDA DA DOENÇA
DE CHAGAS EXPERIMENTAL NO MODELO CÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários, sob orientação da Professora Doutora Marta de Lana.

Ouro Preto - MG

2017

C914a

Cunha, Eleonora Lima Alves.

Avaliação do tratamento com benznidazol, itraconazol e sua associação na fase aguda da doença de Chagas experimental no modelo cão [manuscrito] /

Eleonora Lima Alves Cunha. - 2017.

69f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marta de Lana.

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. Fármacos. 3. Cão como animal de laboratório. I. Lana, Marta de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

" Avaliação do tratamento com benznidazol, itraconazol e sua associação na fase aguda da Doença de Chagas experimental no modelo cão".

Aos dezesseis dias do mês de março de 2017, às 09 horas , no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Eleonora Lima Alves Cunha**. 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. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva
Examinador


Prof.ª Dr.ª Silvane Maria Fonseca Murta
Examinadora


Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 16/03/2017



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

Aos cães que nasceram em prol da
pesquisa, muito obrigada!
À esperança dos portadores da doença de Chagas.

Não foi por falta de opção, nem apenas pelo mercado concorrido, mas pelo sonho e amor a pesquisa!

Primeiramente agradeço a Deus por mais essa vitória!

Aos meus amados pais, Maria Madalena e Luiz, meus maiores incentivadores, obrigada por nunca desistirem dos meus sonhos. Meus irmãos Emanuela e Mário, meus verdadeiros amigos. Ao meu lindo Paulo Henrique, por acreditar no meu potencial, pela paciência inesgotável e por ser meu parceiro mais nerd, que admiro a cada dia mais. AMO VOCÊS!!

A ela, que sentiu, permitiu e lapidou meu instinto de pesquisadora, minha professora, orientadora, amiga e mamis da pesquisa, professora Dra. Marta de Lana.

Aos pós doutorandos Lucas Cunha e Leonardo Pinto, colaboradores assíduos, presentes divinos no meio do caos, que dentre tantos ensinamentos, se tornaram grandes amigos e confidentes.

Ao meu braço direito, minha amiga, parceria, filha, professora de inglês, a aluna dedicadíssima de IC, Fernanda Torchelsen. E agora meu braço esquerdo, o IC caçula Lucas Resende, que já chegou fazendo toda diferença.

O caminho de um pós-graduando é construído desde os primeiros aprendizados e influenciado por grandes mestres e doutores. No ensino médio: o despertar pela leitura e o correto português com a professora Angela Todeschini; a paixão pela biologia com o professor Márcio; o amor a química com a professora Renata. Na graduação: como estudar na pressão com o professor Wellington; a paixão pela farmacologia com o professor Paulo Tostes; os desafios instigantes da parasitologia com o professor carrasco Sílvio; a disciplina em estudar com o professor Leonardo Prates; o amor à primeira vista pela farmacocinética com a professora Gisele Vitalli. Na seleção de mestrado: o despertar apaixonado pelo complexo mundo da imunologia com o professor Luís Crocco; o amor simplificado pela parasitologia com o professor Evandro, e o amor fascinado pela parasitologia clínica com a professora Marta de Lana. No mestrado: o fascínio da cromatografia por Sidney; o amor platônico pela farmacocinética com a professora Rosangela Peccinini; a paciência, amizade e disponibilidade de um pai do professor André Talvani; o estímulo em amadurecimento com o professor Alexandre Reis; o sentido de trabalho em equipe e a carinhosa amizade com a

professora mãe Cláudia Carneiro. Enfim, muito obrigada à todos professores por serem fontes inesgotáveis de inspirações!

Enquanto mestranda, tive apoio e colaboração de vários lugares! LADOC: Maykon e Renata pela persistência em não me deixarem desistir; pelos ensinamentos do mestrando Matheus; pelo apoio e trabalho em momentos difíceis da aluna voluntária Natália; pelo profissionalismo e amizade da técnica Ludmila; Ana Paula, Gabriela e Rafael por completarem a equipe no momento certo. CCA: aos tratadores Cleverson, Christopher, Jadir e Jorginho pela compreensão e dedicação; ao amor pelos cães da veterinária Ana Liz e apoio do veterinário Hugo. LABIIN: Aline, Ana Luísa, Ana Menezes, Débora que sempre foram grandes amigos, principalmente ao Guilherme pela parceria no canil. LIP: a todos pela colaboração sem medir esforços, principalmente Carol, Kátia, Levi e Maria. LIP: prof. Paula Melo pela colaboração e compreensão nos momentos finais; FIOCRUZ: a aluna de doutorado Glaucia Aléssio e o prof. Olindo Martins Filho pelas análises de última hora.

À UFOP, Capes e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, aquele muito obrigada “*ad eternum*”!

A Filosofia do Sucesso

Se você pensa que é um derrotado,
você será derrotado.
Se não pensar “quero a qualquer custo!”
Não conseguirá nada.
Mesmo que você queira vencer,
mas pensa que não vai conseguir,
a vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,
você será fracassado.
Nós descobrimos neste mundo
que o sucesso começa pela intenção da gente
e tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malogrado,
você se torna como tal.
Se almeja atingir uma posição mais elevada,
deve, antes de obter a vitória,
dotar-se da convicção de que
conseguirá infalivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa
aos fortes nem aos espertos.
Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória
é aquele que crê plenamente
Eu conseguirei!

Napoleon Hill

RESUMO

A doença de Chagas (DCh) e seu tratamento permanecem negligenciados e ainda constitui um sério problema de saúde pública na América Latina. O benznidazol (BZ) é atualmente o único fármaco disponível no Brasil para o tratamento da DCh, apresentando efeitos colaterais graves, limitada e variável eficácia terapêutica, especialmente na fase crônica da doença. Após os ensaios clínicos feitos no Brasil demonstrarem que os derivados azólicos de primeira geração não promoveram cura parasitológica e nem impediram a progressão da DCh em humanos, os estudos de associação de fármacos desta classe de compostos com BZ passaram a ser estimulados. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação terapêutica do BZ, itraconazol (ITRA) e de sua associação (BZ+ITRA), em cães infectados com cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) tratados durante a fase aguda da infecção e seu impacto na evolução clínica da doença. O modelo cão foi utilizado por ser considerado ideal para o estudo da DCh e seu tratamento, pois reproduzem as fases aguda e crônica da doença e a manifestação clínica mais importante, a cardiopatia chagásica crônica. Para tal, 20 cães jovens sem raça definida foram inoculados via IP com 2000 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*/kg, e divididos em 4 grupos: I – tratados com BZ: 7 mg/kg em duas doses diárias; II – tratados com ITRA: 6 mg/kg/dia; III – tratados com BZ+ITRA na mesma posologia da monoterapia; IV – grupo controle infectado não tratado. Os animais foram tratados a partir do primeiro dia de parasitemia patente por 60 dias consecutivos. Foram realizados exames de sangue a fresco, hemocultura, reação em cadeia da polimerase (PCR) em eluato de sangue, sorologia convencional (ELISA), PCR quantitativa e histopatologia de tecido cardíaco. Após 18 meses das repetidas avaliações dos animais, foi possível observar uma melhor atividade terapêutica da associação de BZ+ITRA do que nos grupos tratados com ITRA e BZ em monoterapia. De acordo com o critério de cura estabelecido pelo Ministério da Saúde (2016), o cão B8, tratado com BZ+ITRA, apresentou na sua última avaliação resultados negativos nos testes parasitológicos e na ELISA, sugerindo estar curado. Já o cão B4 tratado com ITRA e o cão B7 tratados com BZ+ITRA, apresentaram avaliações parasitológicas negativas, exceto sorologia convencional. Contudo, para a melhor compreensão da cura efetiva dos animais ainda seriam necessárias mais avaliações a longo prazo ou técnicas alternativas.

Palavras-chave: Doença de Chagas aguda, tratamento, associação de fármacos, benznidazol, itraconazol, modelo cão.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) and its treatment remain neglected and constitutes a serious public health problem in Latin America. Benznidazole (BZ) is currently the only drug available in Brazil for its treatment, presenting serious adverse effects, limited and variable therapeutic efficacy, especially in the chronic phase of the infection. After clinical trials in Brazil demonstrate that the first-generation ofazole derivatives did not promote parasitological cure and did not prevent the progression of CD in humans, studies of the association of this class of compounds with BZ have been stimulated. The aim of this study was to evaluate the therapeutic action of BZ, itraconazole (ITRA) and its combination (BZ+ITRA) in dogs infected with VL-10 *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) strain treated during the acute phase and its impact on the disease evolution. The dog model was used because is considered the ideal model for the study of CD and its treatment, because they reproduce the acute and chronic phases of the disease and the most important clinical manifestation, chronic chagasic cardiopathy. Then, 20 young mongrel dogs were inoculated via IP with 2000 *T. cruzi* trypomastigotes/kg and divided into 4 groups: I – treated with BZ: 7mg/kg in two daily doses; II – treated with ITRA: 18 mg/kg/day; III – treated with BZ ITRA in the same dosage of monotherapy; IV – infected not treated control group. The treatment started from the first day of patent parasitemia for 60 consecutive days. Fresh blood exam, hemoculture, polymerase chain reaction (PCR) in blood eluate, conventional serology (ELISA), cardiac tissue quantitative PCR and histopathology. After 18 months of repeated evaluations of the animals, the therapeutic activity was better in the group that received the combination of BZ+ITRA, followed by the groups treated with ITRA and BZ alone, respectively. According to the curing criterion established by MS (2012), the dog B8 treated with BZ+ITRA seems to be cured, because it presented negative results in the parasitological tests and in the ELISA. The dog B4 treated with ITRA and the dog B7 treated with BZ+ITRA had all negative parasitological evaluations, except in conventional serology. However, more evaluations for long time would be needed to better understanding the effective cure of the animals or alternative techniques.

Key words: Acute Chagas disease, chemotherapy, treatment association, benznidazole, itraconazole, dog model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental da avaliação da infecção e da atividade terapêutica.....	31
Figura 2 - Curva de parasitemia média de cães experimentalmente infectados com $2,0 \times 10^3$ tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) por via oral, 60 dias consecutivos, durante a fase aguda da infecção.....	40
Figura 3 - Reatividade sorológica do teste de ELISA em cães dos distintos grupos experimentais infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> não tratados (INT) e tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) ao longo das diferentes avaliações realizadas após o tratamento da fase aguda da infecção.....	44
Figura 4 - Carga parasitária no átrio direito de cães infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> e tratados com BZ, ITRA e BZ+ITRA na fase aguda da infecção. Os valores são expressos com mediana (IQ 25-75%).....	45
Figura 5 - Carga parasitária no ventrículo esquerdo de cães infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> e tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) na fase aguda da infecção. Os valores são expressos em mediana (IQ 25-75%).....	46
Figura 6 - Análise morfométrica do átrio direito e do ventrículo esquerdo mostrando o número de células inflamatórias na coloração por H&E em cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> no 18º mês após o tratamento com a associação BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA).....	50
Figura 7 - Fotomicrografias de infiltrados inflamatórios nos átrio direito e ventrículo esquerdo de cães tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) e grupo controle INT durante a fase aguda da infecção com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> após 18 meses de tratamento.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros biológicos derivados da curva de parasitemia em grupos de cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> tratados durante a fase aguda da infecção.....	41
Tabela 2 - Resultados da técnica parasitológica de hemocultura nas avaliações pós-tratamento de cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> tratados por via oral durante a fase aguda da infecção.	42
Tabela 3 - Resultados da técnica parasitológica molecular de PCR em eluato de sangue nas avaliações pós-tratamento ao longo de 18 meses em cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> tratados por via oral durante a fase aguda da infecção.....	43
Tabela 4 - Resultados da técnica parasitológica molecular de qPCR na avaliação pós eutanásia (18 m.p.t.) em fragmentos cardíacos de cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> tratados por via oral durante a fase aguda da infecção.....	45
Tabela 5 - Carga parasitária em cães infectados com a cepa VL-10 de <i>T. cruzi</i> 18 meses pós-tratamento da fase aguda com BZ, ITRA e a associação BZ+ITRA.....	47
Tabela 6 - Avaliações pós-tratamento e eficácia terapêutica do BZ, ITRA e associação de BZ+ITRA em cães infectados com a cepa VL-10 <i>T. cruzi</i> tratados na fase aguda da infecção.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Microgramas por mililitro
µm ²	Micrômetro ao quadrado
%	Percentual
AP	"Acute phase"
ASC	Área sob a curva
BENEFIT	"Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy"
BZ	Benznidazol
CCA-UFOP	Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto
CD	Chagas disease
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CYP3A4	Citocromo P3A4
CYP51	Citocromo P51
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	"Cronic phase"
DCh	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsilfóxido
DNA	Ácido desorribonucléico
DPMP	Dia do pico máximo de parasitemia
d.p.i.	Dias pós infecção
d.p.t.	Dias pós tratamento
DTU	"Discrept typing unit"
E1224	Pró-fármaco do ravuconazol

EDTA	Ácido etilenodietilnitritoteracético
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
ESF	Exame de sangue a fresco
FA	Fase aguda
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBE	"Fresh blood exame"
FC	Fase crônica
H	Hora (s)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HC	Hemocultura
HCl	Ácido Clorídrico
HITZ	Hidroxiitraconazol
IBE	Inibidores da biossíntese do ergosterol
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
INT	Controle infectado não tratado
IP	Intraperitoneal
ITRA	Itraconazol
IV	Intra-venoso
KCl	Cloreto de potássio
LADOC	Laboratório de doença de Chagas
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LIT	"Liver infusion tryptose"
LMCo	Lise mediada pelo complemento

MG	Minas Gerais
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilogramas
mg/kg/dia	Miligramas por kilogramas por dia
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
m.p.t.	Meses pós tratamento
MS	Ministério da Saúde
N	Número de animais
NF	Nifurtimox
nm	Nanômetro
NUPEB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenileno-diamino
PAR	Parasitemia
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMP	Pico máximo de parasitemia
PP	Período patente
PPP	Período pré-patente
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SRD	Sem raça definida

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris-HCl	Cloridrato de hidroximetilaminometano
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VO	Via oral
WHO	"World Health Organization"

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.2 O cão como modelo experimental na doença de Chagas	21
1.3 Quimioterapia da doença de Chagas humana e no modelo cão	22
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
4.2 Animais	30
4.2.1 Aspectos éticos.....	30
4.3 Infecção dos animais	31
4.4 Avaliação da infecção e durante o tratamento.....	33
4.4.1 Avaliação pós-tratamento.....	33
4.4.2 Necrópsia.....	36
4.4.2.1 Avaliação parasitológica molecular (qPCR) de tecido cardíaco.....	36
4.4.2.2 Avaliações histopatológicas: parasitismo e processo inflamatório	38
4.3 Critério de cura.....	39
4.4 Análise estatística dos resultados	39
5 RESULTADOS.....	40

5.1 Infectividade e curva de parasitemia	40
5.2 Avaliação pós-tratamento e eficácia terapêutica	41
5.2.1 Hemocultura (HC)	41
5.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
5.2.3 Avaliação Sorológica Convencional (ELISA)	43
5.2.4 Avaliação Parasitológica Molecular (qPCR) de tecido cardíaco	44
5.5 Sobrevida dos animais.....	47
5.6 Interpretação da Cura	47
5.6.1 Avaliações histopatológicas por hematoxilina & eosina (H&E)	49
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
8 CONCLUSÃO	60
9 PERSPECTIVAS	61
10 REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A DCh ou Tripanosomíase Americana, descoberta e descrita por Chagas (1909), é ainda negligenciada e na América Latina constitui um sério problema de saúde pública (HOTEZ *et al.*, 2006; SCHMUNIS e YADON, 2010; WHO, 2010). Seu agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário com uma população heterogênea e complexa (DOYLE *et al.*, 1984; TIBAYRENC, 2003), cujo ciclo biológico alterna entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos vetores da família Reduviidae) e vertebrados de diversas ordens, incluindo o homem. A transmissão da DCh para os seres humanos ocorre pelos mecanismos principais (vetorial, transfusão sanguínea, oral, congênita e pelo canal do parto) e secundários (acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados, ingestão de carne crua por canibalismo, transplante de órgãos de doadores infectados, transmissão sexual e outros (COURA, 2015).

Uma vez o indivíduo infectado, estabelece-se uma relação entre o hospedeiro e o parasito que pode durar por toda a vida, embora casos de auto-cura em humanos já tenham sido relatados (ZELEDON *et al.*, 1988; FRANCOLINO *et al.*, 2003).

Carlos Chagas definiu duas fases evolutivas na doença: aguda e crônica (CHAGAS, 1909). Na fase aguda a maioria dos indivíduos é assintomática (95%) e somente 5% apresentam sintomas diversos, observados principalmente em crianças abaixo de cinco anos ou imunossuprimidas, sendo na maioria das vezes oligossintomática. Do ponto de vista laboratorial, a fase aguda corresponde a um período de parasitemia patente, no qual o parasito é encontrado com facilidade no sangue periférico, por meio de exame direto do sangue (BRENER, 1962), bem como nos tecidos em preparações histológicas. A fase aguda evolui naturalmente para a fase crônica, caracterizada pela dificuldade de detecção do parasito no sangue periférico, desaparecimento das manifestações clínicas, queda progressiva até desaparecimento de IgM (que pode permanecer em alguns casos) e elevação dos anticorpos específicos da classe IgG. Nesta fase da doença a maioria dos pacientes apresentam a forma clínica indeterminada, assintomática (PRATA, 2001). Cerca de 20-30% dos pacientes crônicos desenvolvem alterações cardíacas, 10% alterações no trato digestivo (megaesôfago e/ou

megacólon), ou a associação destas alterações, denominada forma mista da doença. Quando desenvolve a forma cardíaca da doença, o paciente pode apresentar cardiomegalia, arritmias ou insuficiência cardíaca devido a cardiomiopatia inflamatória fibrosante (PRATA, 2001; RASSI *et al.*, 2010).

1.2 O cão como modelo experimental na doença de Chagas

O cão juntamente com o gato, foram as primeiras espécies animais que apresentaram o parasito *T. cruzi*, e nele foram feitos os primeiros estudos experimentais por Chagas (1909). Animais como os cães são reservatórios domésticos do *T. cruzi* podendo desenvolver manifestações graves da doença transmitida tanto por vetores ou sua ingestão, o que reforça seu importante papel na epidemiologia da doença (GURTLER, 2007). A infecção por *T. cruzi* causa intensa mortalidade nestes animais, principalmente na fase aguda da infecção natural (GURTLER, 2007) e experimental (LANA *et al.*, 1992). A prevalência da infecção por *T. cruzi* em cães tem sido descrita e elevada em países tais como Paraguai (FUJITA *et al.*, 1994), Argentina e Venezuela (GURTLER, 2007). Infecção natural sintomática tem sido descrita no Sul dos Estados Unidos (KJOS *et al.*, 2008), diferentemente do que se observa no Brasil onde o isolamento do parasito por hemocultura e xenodiagnóstico tem sido rara (ROQUE *et al.*, 2008; NOIREAU *et al.*, 2009), embora os cães estejam expostos à infecção natural pelo vetor ou oral (ingestão do vetor infectado, alimentos contaminados e canibalismo de outros animais infectados).

O cão tem sido descrito como modelo ideal para os estudos em doença de Chagas. Esses animais têm um tempo de vida média longo, aproximadamente 20 anos e reproduzem bem as fases aguda e crônica da doença (ANDRADE, 1984; TAFURI *et al.*, 1988), com evidentes sinais clínicos (PELLEGRINO, 1946; GOBLE, 1952; LARANJA, 1953; KRAMER Jr, 1972), parasitemia patente, resposta imune humoral e celular (LANA *et al.*, 1991; GUEDES *et al.*, 2010), lesões e alterações cardíacas (ANSEMI *et al.*, 1967; ANDRADE, 1984; LANA *et al.*, 1992) e sintomas neurológicos (CAMPOS, 1927; GOBLE, 1952; KOEBERLE, 1958), de forma semelhante ao que é observado na doença humana.

Além de reproduzirem os sinais clínicos, o modelo cão possui uma grande similaridade com a morfofisiologia cardíaca humana (LUMB *et al.*, 1959; MIROWSKI

et al., 1970), sendo ideal para a visualização das alterações cardíacas decorrentes da DCh, consideradas as mais graves manifestações da doença. Manifestações e alterações digestivas foram relatadas por Okumura e Correa Neto (1961) em cães, no entanto, não reproduzida por outros autores.

Desde a década de 80, o cão tem sido utilizado como modelo experimental por nossa equipe do laboratório em estudos sobre a DCh. Tafuri *et al.* (1988) e Lana *et al.* (1992), utilizaram cães sem raça definida para avaliação do desenvolvimento da doença. Os autores demonstraram o desenvolvimento e reprodutibilidade da cardiopatia chagásica crônica fibrosante difusa neste modelo, muito semelhante à doença humana, acompanhada de alterações eletrocardiográficas compatíveis. Os achados eletrocardiográficos nem sempre são associados à presença do parasito, sugerindo a participação do sistema autoimune no desenvolvimento da fibrose cardíaca, com consequente alterações de sua fisiologia (LARANJA, 1953; LARANJA e ANDRADE, 1980; TAFURI *et al.*, 1988).

Pode-se concluir que o modelo cão atende os pré-requisitos exigidos de um modelo adequado para o estudo da DCh, por ser susceptível à infecção, reproduzir as fases aguda e crônica da doença bem como suas diversas formas clínicas do ponto de vista morfofisiológico e clínico, permitir a demonstração do parasito no sangue e tecidos dos animais e apresentar resposta imune celular e humoral semelhante ao homem (WHO, 1984).

1.3 Quimioterapia da doença de Chagas humana e no modelo cão

Desde a descoberta da DCh (CHAGAS, 1909), pesquisadores buscam por uma terapia medicamentosa ideal para o tratamento da doença. Apenas nas décadas de 60 e 70, surgiram dois fármacos com relativo sucesso terapêutico para a DCh. Na classe dos nitrofuranos, apenas o nifurtimox (NF) revelou-se mais efetivo (BOCK *et al.*, 1969). Na classe dos imidazólicos, o BZ mostrou-se ainda mais eficaz no tratamento (BOCK *et al.*, 1969; SCHOFIELD *et al.*, 2006). Estes dois fármacos apresentam índices de curas parasitológicas de até 80% (dependente da cepa do parasito envolvida) em pacientes tratados na fase aguda, considerando resultados negativos para testes parasitológicos e sorológicos (RASSI *et al.*, 2000). Além disto, foi demonstrado que o tratamento nesta fase traz benefícios para os indivíduos chagásicos (SEGURA *et al.*, 1994; ANDRADE e

MAGALHAES, 1996; SOSA ESTANI e SEGURA, 1999; ANDRADE *et al.*, 2004; STREIGER *et al.*, 2004; LANA *et al.*, 2009), bem como melhor prognóstico da doença (ANDRADE *et al.*, 2004), diferentemente do observado em pacientes sintomáticos tratados na fase crônica tardia, o que motivou o estudo BENEFIT (MOLINA *et al.*, 2015), que não demonstrou grandes benefícios do tratamento em pacientes sintomáticos, permanecendo assim a polêmica entre diferentes autores.

Na fase crônica da infecção, a eficácia dos fármacos BZ e NF é de fato muito reduzida, com índices de cura variando entre 0 e 20% (RODRIQUES COURA e De CASTRO, 2002; COURA, 2009), e diversos trabalhos têm demonstrado a resistência natural de várias cepas e clones do parasito ao tratamento (FILARDI e BRENER, 1987; TOLEDO *et al.*, 2003).

As razões para diferenças na eficácia do BZ 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, limitada penetração tecidual (LAMAS *et al.*, 2006; URBINA, 2010) além da resistência natural de algumas cepas do parasito ao tratamento.

O mecanismo de ação do BZ não é completamente elucidado (URBINA e DOCAMPO, 2003) e recentemente, várias hipóteses veem sendo propostas sobre como o BZ exerce seu efeito anti-*T. cruzi*. Estudo *in vitro* com isolado de enzima nitroreductase trypanosomal do tipo I propôs que o BZ atua como um pró-fármaco, formando glioxal, espécie altamente tóxica ao parasito. No entanto, um estudo de análise metabolômica de epimastigotas expostas ao BZ propõe que o modo de ação primária do BZ é interferir nos sistemas antioxidantes do parasito (KEENAN & CHAPLIN, 2015).

O BZ está disponível na clínica em comprimidos de 100 mg e sua posologia consiste na administração oral de 2,5–3,5 mg/kg em adultos, duas ou três vezes ao dia, preferencialmente após as refeições, com regime de tratamento de 60 dias, não excedendo dose diária de 300 mg de BZ (LAFEPE, 2013).

Apesar da relativa eficácia terapêutica, os fármacos NF e o BZ apresentam efeitos colaterais indesejáveis (URBINA, 2001), sendo isto um dos fatores que dificultam a adesão do paciente ao tratamento. Atualmente, apenas o fármaco BZ encontra-se disponível (apenas para os órgãos públicos) para o tratamento humano, devido a comercialização interrompida do NF, pelo desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo (RODRIQUES COURA e De

CASTRO, 2002). Hoje o BZ tem sido produzido pela Argentina, laboratório ELEA (ELEA, 2012), mas sua disponibilidade no Brasil ainda é restrita e mantida sob o controle das Secretarias de Saúde.

Os estudos pré-clínicos realizados ao longo dos anos identificaram algumas classes farmacológicas e estratégias terapêuticas que são especialmente promissoras (SOEIRO *et al.*, 2013; BAHIA *et al.*, 2014). Dentre todos os compostos já estudados como alternativas para o tratamento da doença, os inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE) foram considerados candidatos promissores para tratamentos *in vitro* e *in vivo* (URBINA, 2010). Em especial, os inibidores da enzima 14 α -demetilase (citocromo P51 - CYP51), que bloqueiam a síntese de ergosterol do parasito sem interferir na biossíntese de colesterol do hospedeiro, são em conjunto, os mais promissores candidatos. Ensaio clínicos, incluindo o cetoconazol, o ITRA, o alopurinol e o posaconazol apresentaram resultados contraditórios. Pode-se observar atividade significativa em doses combinadas de triazólicos (cetoconazol e ITRA) incorporados em nanoesferas/nanocápsulas furtivas, mas os mesmos falharam na indução de cura quando testados em camundongos experimentalmente infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (MOLINA *et al.*, 2001). No Brasil, o cetoconazol, ITRA e o alopurinol não foram capazes de erradicar a infecção em animais e humanos, ou de impedir a progressão da doença (BRENER *et al.*, 1993; LAURIA-PIRES *et al.*, 2000). Por outro lado, no Chile, considerável redução na positividade dos testes parasitológicos e regressão ou prevenção das alterações eletrocardiográficas foram observadas após tratamento com esses fármacos em humanos (APT *et al.*, 1998; APT *et al.*, 2003).

O ITRA apresenta atividade supressora contra a infecção de *T. cruzi* em humanos e em animais de experimentação, entretanto não interrompe a progressão da doença e nem leva cura da infecção em monoterapia (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2015). O ITRA é rapidamente convertido via CYP3A4 em metabólito ativo anti-*T. cruzi*, o hidroxitraconazol (HITZ). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o ITRA e HITZ são potentes inibidores da CYP3A4 e da P-gp, o que pode contribuir na modificação das propriedades farmacocinéticas dos fármacos considerados seus substratos, como o BZ (TATEISHI *et al.*, 2008; YAO & SRINIVAS, 2009).

No uso clínico, 50 a 200 mg por dia de ITRA são usados para o tratamento de dermatomicoses ou candidíase vaginal, com duração do tratamento inferior a 1 mês. A

incidência de efeitos colaterais é de 7%, e quando utilizado por um maior período de tempo, este índice aumenta para 12,5%. As reações adversas que ocorrem com maior frequência incluem náuseas (2,4%), dores abdominais (1,4%), vômitos (0,8%), diarreia (0,6%), anorexia (0,3%), dores de cabeça (1,5%), tonturas (0,7%), erupção cutânea (1,1%), prurido (0,7%), fadiga (0,5%), febre (0,3%) e mal-estar (0,1%). A elevação dos testes de função hepática ocorre em 0,3% a 5% dos pacientes. Entretanto, o ITRA tem sido raramente relatado como causador de lesão hepática sintomática (GUPTA *et al.*, 1994).

Recentemente, os triazólicos posaconazol e o E1224 (pró-fármaco do ravuconazol) foram avaliados em ensaios clínicos de fase II no tratamento de indivíduos assintomáticos na fase crônica da DCh. Entretanto, os resultados clínicos evidenciaram que apesar do posaconazol e E1224 apresentarem perfil favorável de segurança e toxicidade, eles falharam em induzir cura parasitológica em cerca de 90% dos pacientes tratados (MOLINA *et al.*, 2015). Situação semelhante aconteceu nos ensaios em modelos animais tais como o albaconazol (GUEDES *et al.*, 2004) e o ITRA (ASSÍRIA-MARTINS *et al.*, 2015). Verificou-se ainda nestes estudos, resultados contraditórios na eficácia terapêutica entre diferentes modelos experimentais e ainda com os obtidos em humanos. Esses estudos em conjunto mostram a necessidade de busca de novos fármacos e/ou protocolos de tratamento mais eficazes para os pacientes considerando as propriedades farmacocinéticas de cada fármaco.

O cão tem sido também utilizado como modelo experimental para estudos de quimioterapia na DCh. Nosso grupo já demonstrou que cães tratados com o fármaco convencional, o BZ, apresentaram resultados muito semelhantes ao observado em humanos em ambas as fases da doença. Os exames laboratoriais utilizados na monitoração pós-tratamento e avaliação da eficácia do tratamento, sejam parasitológicos (HC e PCR), sorologia convencional (ELISA) e não convencional (Lise Mediada por Complemento - LMC^o) apresentaram resultados semelhantes ao observado nas avaliações de pacientes (GUEDES *et al.*, 2002). O mesmo foi observado também por nossa equipe na avaliação de vários dos derivados azólicos tais como o albacanozol (GUEDES *et al.*, 2004) e ravuconazol (DINIZ *et al.*, 2010) comparativamente ao BZ.

Diante do fracasso dos ensaios clínicos com os IBE na DCh, *a associação medicamentosa está sendo promovida como terapêutica de primeira linha em programas de acesso a diversos tratamentos,* incluindo a DCh (FARIAS *et al.*, 2006).

Efeitos sinérgicos foram comprovados por (ARAÚJO *et al.*, 2000), quando associaram BZ e cetoconazol no tratamento de camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, considerada parcialmente resistente ao BZ. Entretanto, os autores não obtiveram sinergismo do tratamento em camundongos infectados com outra cepa de *T. cruzi* (cepa Colombiana, resistente ao tratamento) e tratados com a mesma associação, demonstrando novamente que efeitos terapêuticos são influenciados pela genética do parasito.

Os benefícios advindos da utilização de uma associação terapêutica podem estar relacionados tanto ao sinergismo de diferentes mecanismos de ação, quanto a modificações nos parâmetros farmacocinéticos, o que foi verificado por nós quando associamos o BZ e ITRA no tratamento de camundongos (MOREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2012). Assíria-Martins *et al.* (2015) também observaram melhores resultados com esta associação em modelo murino infectado com a cepa Y, parcialmente resistente ao tratamento, quando tratados com doses sub ótimas de ambos (75 mg), tanto na supressão ou eliminação da parasitemia, semelhante ao observado por Strauss *et al.* (2013) neste mesmo modelo animal, associado ainda à redução dos processos inflamatórios e fibróticos, bem como nos índices de cura.

Cencig *et al.* (2012) investigaram a associação de BZ com outros três fármacos (NF, posaconazol e anfotericina B), em ambas as fases da doença humana. Os resultados sugeriram que quando foi associado BZ aos outros fármacos em períodos mais curtos de tratamentos, a cura foi observada mais rapidamente em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*, exceto com a associação BZ e posaconazol. O fato de encurtar os períodos de tratamento com eficácia terapêutica é um dos objetivos da associação de fármacos, onde podem ser limitadas suas reações adversas e efeitos tóxicos. Pode-se observar também a influência da cepa no tratamento da DCh, mostrando que a genotipagem auxilia na indicação de melhores esquemas terapêuticos, aumentando assim a eficiência e motivação para se optar pelo tratamento (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2015).

No estudo da associação de BZ a um antiparasitário, o cloridrato de clomipramina (STRAUSS *et al.*, 2013), na fase aguda da infecção com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, também foram observados melhores resultados referentes à redução significativa da mortalidade, parasitemia e dos efeitos colaterais em camundongos experimentalmente infectados.

Por estas razões, este projeto tem como objetivo central avaliar a associação de drogas no tratamento da DCh experimental no modelo cão paralelamente à avaliação dos parâmetros farmacocinéticos.

2 JUSTIFICATIVA

Este projeto se justifica considerando:

- (i) que a avaliação de associação de fármacos ativos com o *T. cruzi* tem sido recomendada como perspectiva a ser explorada na quimioterapia da DCh;
- (ii) que estes fármacos estão disponíveis e já são utilizados em humanos;

e que a utilização de um modelo experimental de maior porte como o cão, que reproduz as diferentes fases da doença, alterações clínicas, formas clínicas e lesões compatíveis com a DCh semelhantes à doença humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação terapêutica do BZ, ITRA e de sua associação (BZ+ITRA), em cães infectados com cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados durante a fase aguda da doença e seu impacto na evolução da infecção.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar o perfil parasitológico e clínico da infecção dos cães tratados na fase aguda;

3.2.2 Avaliar a ação terapêutica dos tratamentos realizados de acordo com os parâmetros considerados nos critérios de cura clássico e mais atuais, e seu impacto na evolução da infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepa de *Trypanosoma cruzi*

A cepa de *T. cruzi* utilizada foi a VL-10, pertencente à DTU II (ZINGALES *et al.*, 2009). Esta cepa é considerada resistente ao tratamento com BZ em modelo murino (FILARDI e BRENER, 1987) e foi obtida de um paciente na forma indeterminada da DCh proveniente da cidade de Virgem da Lapa, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais (SCHLEMPER-JUNIOR *et al.*, 1986), uma importante zona endêmica da DCh no Brasil.

4.2 Animais

Foram utilizados 20 cães jovens sem raça definida (SRD), de ninhadas diferentes, ambos os sexos, com idade de 4 - 6 meses, pesando entre 15 a 20 kg, obtidos e mantidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais receberam água e ração comercial “*ad libitum*”, foram tratados previamente com anti-helmínticos e imunizados contra doenças infecciosas (Cinomose, Adenovírus tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e Leptospirose canina).

4.2.1 Aspectos éticos

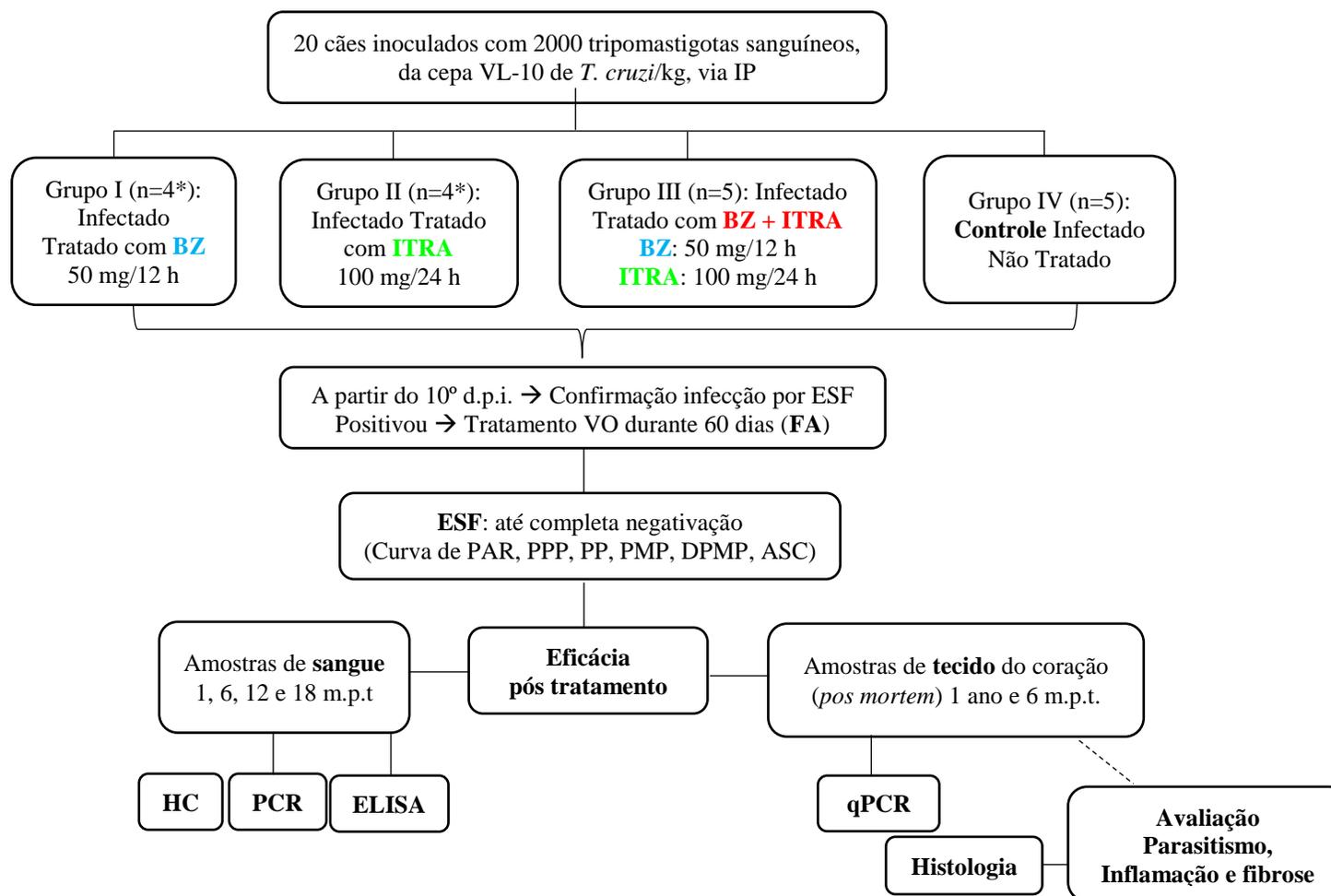
O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), sob o protocolo n°. **2013/28**.

A manutenção e o manuseio dos animais em experimentação foram de acordo com a legislação vigente estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Infecção dos animais

Todo delineamento experimental desta pesquisa está apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental da avaliação da infecção e da atividade terapêutica.



Delineamento experimental de cães infectados com a cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados na fase aguda da infecção com benznidazol, (BZ) itraconazol (ITRA) e benznidazol associado ao itraconazol (BZ+ITRA). IP: intraperitoneal; d.p.i.: dias pós infecção; ESF: exame de sangue a fresco; VO: via oral; FA: fase aguda; h: horas; *morte/perda; PAR: parasitemia; PPP: período pré patente; PP: período patente; DPMP: dia do pico máximo de parasitemia; PMP: pico máximo de parasitemia; ASC: área sob a curva; m.p.t.: meses pós tratamento; HC: hemocultura; PCR: reação em cadeia da polimerase; ELISA: “enzime-linked-immunosorbent-assay”; qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa.

A obtenção do inóculo com a cepa VL-10 de *T. cruzi* foi realizada no 10º dia de infecção em camundongos Swiss (pico de parasitemia para cepa VL-10), mediante retirada do sangue do plexo orbital. Em cada passagem, o número de formas tripomastigotas foi determinado de acordo com a técnica descrita por Brener (1962). Para o seu ajuste foi usado PBS estéril pH 7,2.

Após a obtenção dos inóculos padronizados, os cães foram inoculados pela via intraperitoneal com 2.000 tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 por quilograma de peso corporal.

4.4 Grupos Experimentais e Tratamento dos Animais

Os 20 cães, infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi*, foram distribuídos em quatro grupos considerando ou não os tratamentos com BZ, ITRA ou sua associação. A partir do primeiro dia de parasitemia patente, fase aguda da doença confirmada por exame de sangue a fresco (ESF), os animais receberam dose única oral dos fármacos durante 60 dias consecutivos junto com patê próprio para cães. Os animais do Grupo I (n=5) receberam dose oral de 7 mg/kg/2x ao dia (50 mg/12h) de BZ (benznidazol, comprimido 100 mg, lote L13030214, LAFEPE, Pernambuco, Brasil), segundo o estabelecido para humanos (RODRIQUES COURA e De CASTRO, 2002) e por Guedes *et al.* (2002) para o modelo cão. Os animais do Grupo II (n=5) receberam dose oral de 6 mg/kg/dia (100 mg/24 h) de ITRA (Sporanox®, cápsula de 100 mg, lote UGL038, Janssen-Cilag Farmacêutica, São Paulo, Brasil), segundo (RODRIQUES COURA e De CASTRO, 2002). No Grupo III, os cães (n=5) receberam dose oral de 7 mg/kg/2x ao dia (50 mg/12h) de BZ (benznidazol, comprimido 100 mg, lote L13030214, LAFEPE, Pernambuco, Brasil) e 6 mg/kg/dia (100 mg/24 h) de ITRA (Sporanox®, cápsula de 100 mg, lote UGL038, Janssen-Cilag Farmacêutica, São Paulo, Brasil). O Grupo IV (n=5) ou controle (INT), foi constituído por animais infectados não tratados.

4.4 Avaliação da infecção e durante o tratamento

A avaliação da parasitemia foi realizada diariamente segundo Brener (1962) e com os dados obtidos foi traçada a curva da parasitemia constituída pela média da parasitemia diária registrada/0,1 mL de sangue. A curva de parasitemia foi plotada utilizando a média diária da parasitemia dos animais de cada grupo experimental. A partir da curva de parasitemia, foram determinados os seguintes parâmetros biológicos: período pré-patente (PPP), período patente (PP), pico máximo de parasitemia (PMP), dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) e área sob a curva (ASC).

Somente após a confirmação do primeiro dia de parasitemia patente (média de 19 dias de infecção) é que os cães foram imediatamente tratados na fase aguda da doença.

4.4.1 Avaliação pós-tratamento

A eficácia do tratamento foi avaliada diariamente por ESF segundo Brener (1962) (e por métodos parasitológicos de HC, PCR e método sorológico convencional (ELISA) realizados no 1º, 6º, 12º e 18º meses de infecção. Após necropsia ou morte natural devido à infecção aguda ou acidental (briga dos animais), tecidos do coração foram coletados para serem analisados por qPCR e por histopatologia, em relação ao parasitismo tecidual, processo inflamatório e fibrose.

4.4.1.1 Avaliações Parasitológica (HC) e Parasitológica Molecular (PCR) do sangue

4.4.1.1.1 Hemocultura (HC)

A técnica de HC foi realizada seguindo a metodologia descrita por Chiari *et al.* (1989), com algumas modificações. Para tal foram coletados 10 mL de sangue por via intravenosa (cefálica), em tubo estéril de plástico, que foram imediatamente centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. O plasma foi descartado e posteriormente adicionado de 5 mL de meio de cultura LIT (CAMARGO, 1964) sendo novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Em seguida, o tubo contendo as hemácias foi novamente lavado com meio LIT e

centrifugado como anteriormente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, a camada leucocitária removida para um tubo cônico e resuspensa em 5mL de meio LIT. Posteriormente, as hemácias distribuídas em porções iguais em dois tubos cônicos contendo 5 mL de LIT cada. Estes tubos foram incubados em estufa a 28°C e homogeneizados a cada 48h. Uma gota do sedimento de cada preparação foi analisada ao microscópio óptico 30, 60, 90 e 120 dias após a coleta para a detecção de parasitos.

4.4.1.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização desta técnica, foram coletados 10 mL de sangue venoso de cada cão (veia cefálica) e o mesmo transferido para tubos cônicos plásticos com igual volume de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (Sigma[®] Chemical Company, USA) pH 8,0 (AVILA *et al.*, 1991). Essa mistura de sangue/guanidina e EDTA, foi mantida à temperatura ambiente e após sete dias fervida em banho-maria a 100°C por 10 minutos (BRITTO *et al.*, 1993). O lisado foi estocado à temperatura ambiente.

A extração do DNA a partir de uma alíquota do lisado sanguíneo foi realizada empregando o kit “DNeasy Blood & Tissue Kit[®]” (Qiagen Inc., EUA) e o protocolo de extração conforme as instruções do fabricante.

Para a amplificação do DNA foram utilizados os pares de iniciadores: #121 (AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA) e #122 (GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, na região de 330 pares de bases. Para a amplificação do gene constitutivo de cão, foram utilizados os pares de iniciadores do gene GAPDH: Fw (5' CTA CCC ACG GCA AAT TCC 3') e Rw (5' ACT CAG CAC CAG CAT CAC 3'), os quais amplificam um produto de 129 pares de bases (GENBANK: AB038240.1).

A reação constituiu de: 6,5 pmol de cada iniciador (#121 e #122) ou 2,5 pmol (GAPDH), 6,25 µL de GoTaq[®] Green Master Mix 2X (Promega, Madison, USA) e 5,0 µL de DNA e Água Milli Q, totalizando 15,0 µL por poço da placa (MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems).

As condições utilizadas na reação de PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e

uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Verit Thermal Cycler 96well (Applied Biosystems[®], Califórnia, USA).

A visualização do material amplificado foi realizada por meio do aparelho de eletroforese capilar QIAxcel Advanced System[®] (Qiagen), método de análise AM320, marcador de alinhamento de 15pb / 600pb (QX Alignment Marker[®], Qiagen) e marcador de peso molecular de 25 pb/500 pb (QX Size Marker[®] Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante para os tamanhos dos fragmentos analisados. Após a eletroforese, a presença/ausência de bandas nas regiões de interesse ou o eletroferograma, foram obtidos por meio do software QIAxcel ScreenGel 1.2.0[®] (Qiagen). A hipótese de contaminação foi eliminada através da utilização de um controle negativo da reação e da extração, bem como um controle de reagentes da extração e da PCR.

4.4.1.1.3 Avaliação Sorológica Convencional – “Enzime-linked-immunosorbent-assay” (ELISA)

Coletas de sangue dos cães foram feitas 30 dias e semestralmente pós tratamento e no dia da necrópsia. O soro foi coletado e armazenado a -22°C até ser examinado. Foram utilizados antígeno alcalino de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, obtidos de cultivo acelular em meio LIT (VITOR e CHIARI, 1987).

Como conjugado foram utilizadas anti-imunoglobulinas de cão (IgG) marcadas com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). A técnica de ELISA foi utilizada para detecção de imunoglobulina G anti-*T. cruzi* e realizada segundo a metodologia descrita por (VOLLER et al., 1976), modificada de acordo com Santos *et al.* (2012). Cada poço da placa foi tratado com 100µL do extrato antigênico de epimastigotas, na concentração definida previamente por titulação em bloco (5µg/mL), e diluído em solução tampão carbonato (pH 9,6). As placas foram incubadas a 4°C por 18h e após este intervalo de tempo foram bloqueadas com 100µl/poço de PBS + SFB 5% e incubadas a 37°C por 30 minutos. A próxima etapa consistiu na adição de 100µL do soro de cada animal, diluído na proporção de 1:80 em PBS-Tween 0,05%, e incubados a 37°C por 45 minutos. Posteriormente foram adicionados 100µL/poço do anticorpo conjugado, diluído a 1/8000 em PBS-Tween 0,05%, conforme titulação prévia, e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 45 minutos. Ao final, foram adicionados 100µl/poço da solução de substrato [1µg de Orto-fenileno-diamino-OPD, 15mL de solução de ácido cítrico e 3µL de H₂O₂ (volume 30)] e decorridos 10 minutos

de incubação a 37°C; a reação foi interrompida com a adição de 32µl/poço de ácido sulfúrico 4M. Entre cada etapa, as placas foram submetidas a quatro lavagens com solução salina (NaCl 9g/Tween-20 0,5mL, e H₂O qsp 1L). A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO RAD, Modelo 680) com filtro de 490nm. Em cada placa foram adicionados 10 soros controles negativos e quatro controles positivos. A absorbância discriminante, em cada placa, foi calculada tomando-se a média da absorbância dos 10 soros negativos somados a dois desvios padrões, sendo os valores encontrados abaixo do índice de reatividade considerados negativos e acima considerados positivos.

4.4.2 Necrópsia

Os cães de cada grupo experimental foram submetidos a coleta de material “*pos mortem*”, 18 meses após o término do tratamento. Os animais foram eutanasiados utilizando anestesia com tiopental (no mínimo 25 mg/Kg/via intravenosa, até obtenção de plano anestésico adequado III a IV) posterior aplicação de cloreto de potássio 10% diluído em PBS.

Durante a necrópsia, foram seccionados e coletados fragmentos do coração (átrio direito e ventrículo esquerdo). Partes destes fragmentos foram armazenadas em cassetes e conservadas em metanol/DMSO (concentrações 80/20) para posteriores avaliações histológicas. A outra parte dos fragmentos foi novamente processada, armazenada em papel alumínio e conservada em freezer -80°C para posteriores avaliações parasitológicas moleculares pela qPCR, dando sequência a avaliação pós tratamento.

4.4.2.1 Avaliação parasitológica molecular (qPCR) de tecido cardíaco

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) foi realizada de acordo com o protocolo padronizado por Caldas (2011). Esta técnica tem como objetivo a quantificação do parasitismo tecidual no coração dos animais.

Os fragmentos foram cortados com auxílio de lâmina e bisturi, lavados com PBS, e pesados com aproximadamente 25-30 mg de cada. As amostras foram transferidas para os tubos de 1,5 mL e em seguida, foram realizados os procedimentos de extração do DNA total, utilizando o kit WizardTM Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Inicialmente foi realizada adição de 500uL de solução de lise nuclear sendo os tubos mantidos em gelo por 2 minutos. Após

homogeneização por inversão dos tubos, foram adicionados 20,0 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20,0 mg/mL. Após este período, eles foram adicionados de 3 µL de RNase e as amostras foram incubadas por 30 minutos em banho seco a 37°C. Após incubação, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos e adicionados 200 µL da solução de precipitação de proteínas. Com o auxílio do vortex (*Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA*), as amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 16.000g (Microcentrífuga Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600 µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha). Esse tubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 g. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi adicionado de 200 µL de solução de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha). Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 16.000 g, e novamente descartado o sobrenadante. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% remanescente e em seguida foram adicionados de 100 µL de solução de hidratação. O DNA permaneceu reidratando por 24h à temperatura ambiente. Em seguida, a concentração e a qualidade do DNA obtido foram determinadas por espectrofotômetro (Nanodrop, GE Healthcare Products).

Para realizar a quantificação do parasitismo tecidual nos fragmentos por qPCR foi necessário construir uma curva padrão para determinar o número de cópias do DNA do parasito existente na amostra. Para tal foram utilizadas formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* crescidas em meio de cultura (LIT) até atingir o número total de $1,0 \times 10^8$ parasitos contados em câmara de Neubauer, os quais foram submetidos ao protocolo de extração de DNA já descrito. Após eluição do pellet de DNA extraído em 100 mL de água ultrapura autoclavada, a concentração obtida foi de 10^6 parasitos/mL, assumindo-se que a extração foi 100% eficiente. A seguir foram feitas diluições seriadas do DNA em água ultrapura autoclavada (1:10) para obter sete pontos na curva variando de 10^6 a 1 parasitos.

Cada amostra foi analisada em duplicata para amplificação do DNA de *T. cruzi* e em cada reação de qPCR foram utilizados 3,0 µL da amostra extraída e diluída (contendo 10,0 ng de DNA genômico), 5,0 µL de “SYBR Green PCR Mastermix” (Applied Biosystems) e 2,0 µL de iniciadores. Os iniciadores utilizados para a amplificação do DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; sendo amplificado um produto de 182 pb (CUMMINGS e TARLETON, 2003).

Para cada amostra foi também realizada uma reação para dosar o gene constitutivo de cão (GAPDH), utilizado como controle endógeno, empregando-se 3,0 µL da amostra extraída (10,0 ng de DNA genômico) 5,0 µL de “SYBR Green PCR Mastermix” (Applied Biosystems) e 2,0 µL de iniciadores. Os iniciadores para o GAPDH foram: Fw (5' CTA CCC ACG GCA AAT TCC 3' e Rw (5' ACT CAG CAC CAG CAT CAC 3'), sendo amplificado um produto de 129 pb (GENBANK: AB038240.1). A reação foi sempre realizada em paralelo a controles negativos, que foram submetidos à reação com os iniciadores específicos do *T. cruzi* e GAPDH de cão. Também foram utilizados como controle negativo da reação, poços com iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença de DNA. Cada amostra de DNA foi quantificada em triplicata (duplicata para *T. cruzi* e unicata para GAPDH). As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™). As amostras foram então submetidas a desnaturação inicial à 95°C por 10 min., seguida por 40 ciclos à 95°C por 15 segundos e 63°C por 1 minuto.

4.4.2.2 Avaliações histopatológicas: parasitismo e processo inflamatório

4.4.2.2.1 Coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E)

As análises histopatológicas de fragmentos do coração [(átrios direito e ventrículo esquerdo)] foram realizadas no 18º mês após o tratamento. Estes foram escolhidos por serem onde mais se encontram parasitismo em tecido, cardíaco na experiência de nosso grupo com o modelo cão infectado com diversas cepas de *T. cruzi*. Foram realizados cortes seriados que foram desparafinizados em imersões em xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em água corrente e em tampão fosfato (PBS). O infiltrado inflamatório cardíaco foi avaliado em cortes de tecidos corados por H&E de 4µm da mesma área da que foram tirados os fragmentos examinados por qPCR. As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico (Leica DM5000B). A análise de inflamação foi realizada utilizando o software Leica QWin (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os estudos morfométricos envolveram a análise de 20 campos selecionados aleatoriamente (área total $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) de seções de tecido em uma única lâmina por animal. O infiltrado de células inflamatórias nos fragmentos cardíacos foi quantificado pela contagem dos núcleos celulares presentes nas seções dos fragmentos e a diferença entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados e o observado em animais não infectados determinou o

número de células inflamatórias. Os dados foram expressos como número médio \pm desvio padrão de células nucleadas como previamente descrito por Maltos *et al.* (2004).

4.3 Critério de cura

Para avaliar a eficácia terapêutica pós-tratamento dos animais infectados, foram considerados dois critérios de cura: o mais atual (MS, 2012) que considera como **curados** os animais que apresentam todos os testes parasitológicos (ESF, HC, xenodiagnóstico, PCR), e da sorologia convencional (ELISA, IFI, HAI, RFC) negativos, considerada padrão ouro de cura na avaliação pós-tratamento; **não curados** os que apresentam todos ou pelo menos algum destes exames parasitológicos positivos e/ou sorologia convencional positiva. Na ausência de exames parasitológicos positivos, a queda sorológica progressiva pós-tratamento é considerada como indicativa de **processo de cura em andamento** (RASSI E LUQUETTI, 2003). Por outro lado, o critério de cura clássico se atem a considerar como não curado aquele indivíduo/hospedeiro que apresentar sorologia positiva em qualquer título sorológico, mesmo na presença de exames parasitológicos repetidamente negativos.

Adicionalmente, resultados da qPCR em tecido cardíaco foram incorporados na última avaliação dos animais para serem analisados em conjunto com as demais metodologias empregadas anteriormente na avaliação pós-tratamento.

4.4 Análise estatística dos resultados

Para cada tipo de tratamento, foram comparados os parâmetros biológicos derivados da curva de parasitemia (PAR), o infiltrado inflamatório e a quantificação da qPCR, em relação ao grupo controle (INT) e entre si. Os dados que apresentaram distribuição não paramétrica ou com ausência de homogeneidade foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Prisma versão 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc., EUA) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

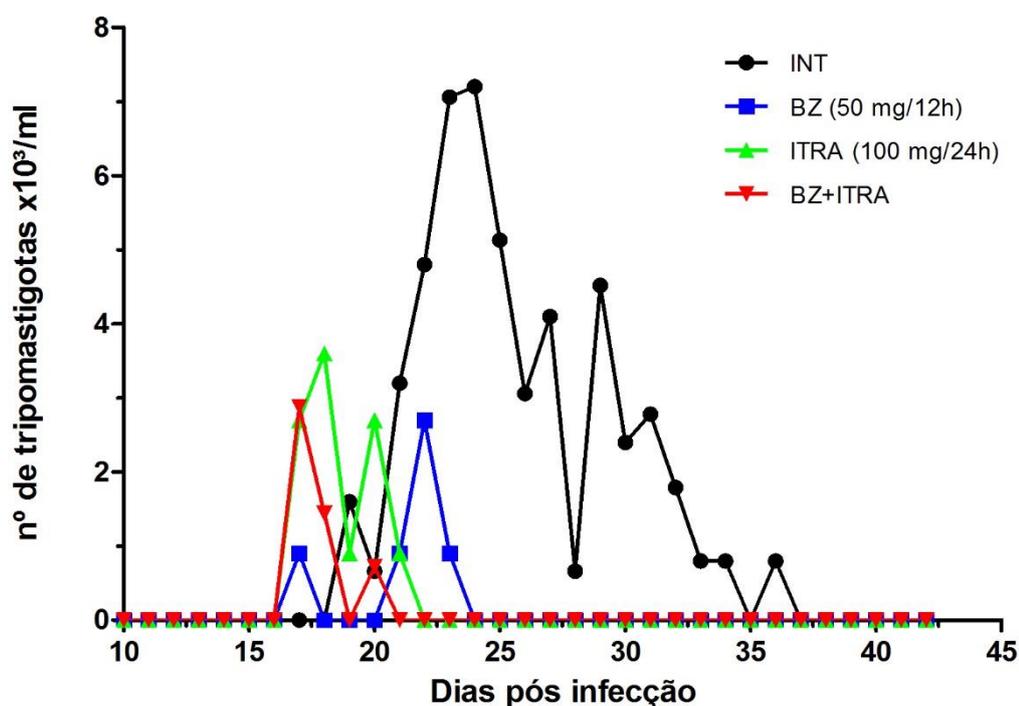
5 RESULTADOS

5.1 Infectividade e curva de parasitemia

A taxa de infectividade foi de 100% dos animais em todos os grupos experimentais.

As curvas médias de parasitemia obtidas por ESF estão apresentadas na **Figura 2**.

Figura 2 - Curva de parasitemia média de cães experimentalmente infectados com $2,0 \times 10^3$ tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de *T. cruzi* tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) por via oral, 60 dias consecutivos, durante a fase aguda da infecção.



INT: infectado não tratado; BZ: benznidazol; ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol; nº: número.

A comparação intergrupos dos parâmetros derivados da curva de PAR como média \pm desvio padrão estão expressos na **Tabela 1**. O PPP variou entre 16 a 22 dias e apresentou diferença entre o grupo INT ($19,80 \pm 1,79$) e o grupo infectado tratado com BZ+ITRA ($16,20 \pm 0,45$). O PP foi maior no grupo INT ($12,60 \pm 3,29$) comparado aos grupos infectados que não receberam tratamento. Houve diferença entre os grupos INT e o grupo infectado tratado com BZ ($1,50 \pm 1,00$), entre o grupo INT e o grupo infectado e tratado com BZ+ITRA ($1,80 \pm$

1,30). Em relação ao PMP, todos os grupos infectados que receberam tratamento apresentaram parasitemia menores e iguais ($3,60 \pm 0,0$) se comparados ao grupo INT ($12,24 \pm 2,88$). Já em relação ao DPMP, apenas os grupos infectados tratados com ITRA ($17,25 \pm 0,50$) e BZ+ITRA ($17,20 \pm 0,45$) apresentaram diferença em relação ao grupo INT ($23,80 \pm 2,17$).

Tabela 1 - Parâmetros biológicos derivados da curva de parasitemia em grupos de cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* tratados durante a fase aguda da infecção.

Grupos	PPP (dias) ± DP	PP (dias) ± DP	PMP ($\times 10^4$) ± DP	DPMP (dias) ± DP	ASC ($\times 10^4$) ± DP
INT	$19,80 \pm 1,79$	$12,60 \pm 3,29$	$12,24 \pm 2,88$	$23,80 \pm 2,17$	$51,36 \pm 9,16$
BZ	$19,50 \pm 2,38$	$1,50 \pm 1,00^*$	$3,60 \pm 0,0^*$	$20,50 \pm 2,38$	$5,40 \pm 3,60^*$
ITRA	$16,25 \pm 0,50$	$4,00 \pm 0,82$	$3,60 \pm 0,0^*$	$17,25 \pm 0,50^*$	$10,80 \pm 0,0$
BZ+ITRA	$16,20 \pm 0,45^*$	$1,80 \pm 1,30^*$	$3,60 \pm 0,0^*$	$17,20 \pm 0,45^*$	$5,04 \pm 1,97^*$

PPP: período pré-patente; PP: período patente; PMP: pico máximo de parasitemia; DPMP: dia do pico máximo de parasitemia; ASC: área sob a curva; DP: desvio padrão; BZ: benznidazol; ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol; INT: infectado não tratado; * $p \leq 0,05$.

A comparação da ASC (parasitemia) entre os grupos de cães infectados tratados com BZ e BZ+ITRA revelou semelhança. As ASC foram significativamente menores ($5,40 \pm 3,60$ e $5,04 \pm 1,97$) nestes grupos que o observado no grupo controle INT ($51,36 \pm 9,16$). Já o grupo infectado tratado com ITRA não apresentou diferença significativa na ASC ($10,80 \pm 0,0$) quando comparado aos grupos BZ e BZ+ITRA, embora seu valor tenha sido significativamente menor que o observado no grupo controle (INT).

5.2 Avaliação pós-tratamento e eficácia terapêutica

5.2.1 Hemocultura (HC)

As avaliações da infecção e da falha terapêutica pela técnica parasitológica de HC estão expressas na **Tabela 2**. Foi observado 100,0% de positividade dos animais do grupo controle INT e maior negatividade nos grupos de animais infectados que receberam tratamento. Foi constatada falha terapêutica em todos os grupos, sendo maior no grupo

infectado tratado com ITRA (50%), intermediária no grupo infectado tratado com BZ+ITRA (40,0%) e menor falha terapêutica no grupo infectado tratado com BZ (33%).

Tabela 2 - Resultados da técnica parasitológica de hemocultura nas avaliações pós-tratamento de cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* tratados por via oral durante a fase aguda da infecção.

Grupos (n= 18)	Positivo (%) (n° positivos/n° avaliações)	Negativo (n° negativos/n° avaliações)
BZ	33%	67%
(n = 4*)	(1/3)	(2/3)
ITRA	50%	50%
(n = 4)	(2/4)	(2/4)
BZ+ITRA	40%	60%
(n = 5)	(2/5)	(3/5)

n: número de animais; n°: número; BZ: benznidazol; ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol; *p≤ 0,05.

5.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As avaliações da infecção pela técnica parasitológica molecular de **PCR** estão expressas na **Tabela 3**. Foi observado maior negatividade nos grupos de animais infectados que receberam tratamento. Foi observado PCR negativa em todos os grupos, sendo maior no grupo ITRA (25%), intermediária no grupo BZ+ITRA (20%) e nenhuma negativação no grupo BZ. Esta positividade oscilou na maioria dos animais tratados (10/12 animais).

Dois animais apresentaram negatividade em todas as avaliações da PCR, um do grupo infectado tratado com ITRA (animal B4) e outro do grupo infectado tratado com BZ+ITRA (animal B7).

Tabela 3 - Resultados da técnica parasitológica molecular de PCR em eluato de sangue nas avaliações pós-tratamento ao longo de 18 meses em cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* tratados por via oral durante a fase aguda da infecção.

Grupos (n= 18)	Falha terapêutica % (n° positivos/n° avaliações)	Negatividade (n° negativos/n° avaliações)
BZ (n = 3*)	100% (3/3)	0% (0/3)
ITRA (n = 4)	75% (3/4)	25% (3/4)
BZ+ITRA (n = 5)	80% (4/5)	20% (1/5)

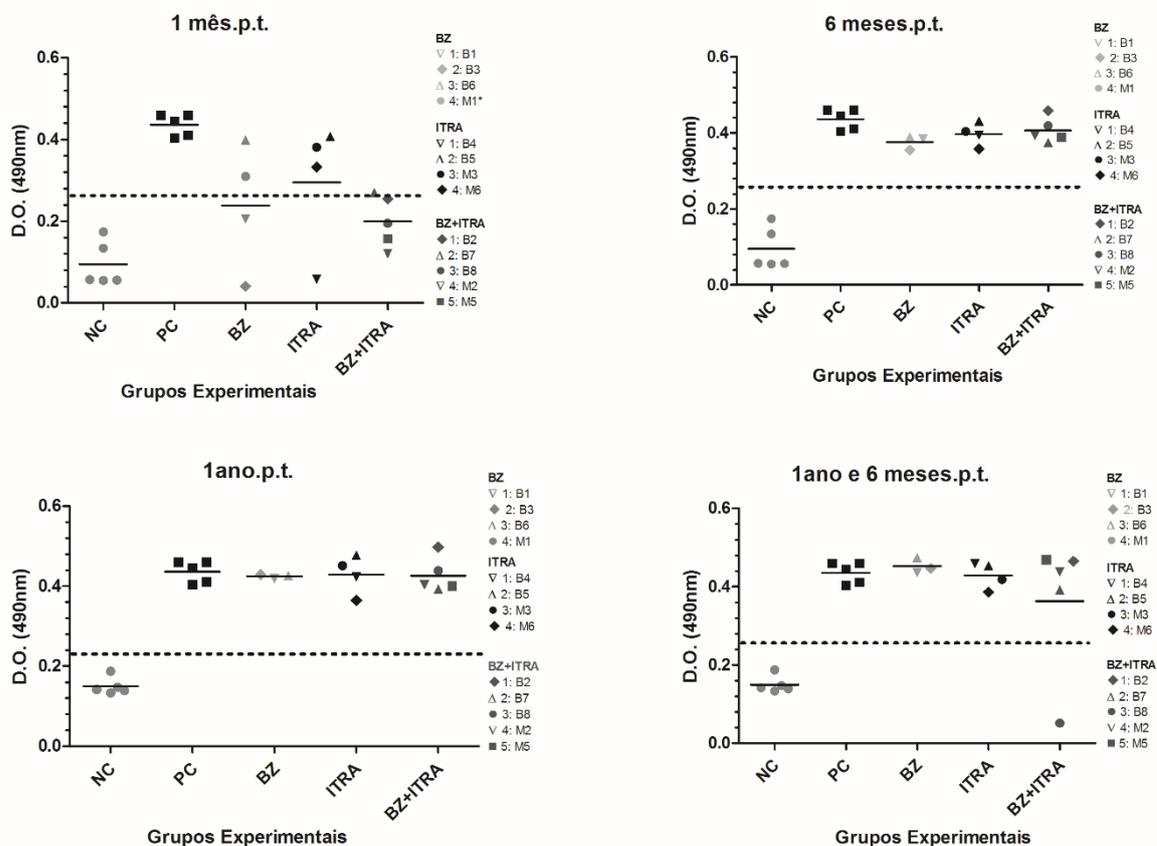
n: número de animais; n°: número; BZ: benznidazol; ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol; *morte; $p \leq 0,05$.

5.2.3 Avaliação Sorológica Convencional (ELISA)

A avaliação sorológica convencional pelo teste de ELISA dos animais tratados revelou que na primeira avaliação (1 m.p.t.) 2 animais, um tratado com BZ e outro com BZ+ITRA, estavam na zona cinza de reatividade; 4 animais, um tratado com BZ, outro com ITRA e dois com BZ+ITRA, estavam com reatividade abaixo do ponto de corte. Os três animais restantes que receberam tratamento, apresentaram sorologia positiva, ou seja, acima da zona cinza. Na segunda e terceira avaliações (6 e 12 m.p.t.), todos os animais tratados apresentaram sorologia positiva e com níveis variáveis.

Na última avaliação (18 m.p.t.), apenas 1 animal tratado com BZ+ITRA apresentou reatividade abaixo da zona cinza (cão B8), sendo considerado negativo sorologicamente (**Figura 3**). Pode ainda ser observado na sequência das avaliações, que o grupo de animais tratados com BZ apresentou reatividade mais alta em relação aos demais grupos tratados, ao contrário do grupo tratado com BZ+ITRA que na última avaliação apresentou menor média de reatividade, devido a negatificação sorológica do cão B8 (**Figura 3**).

Figura 3 - Reatividade sorológica do teste de ELISA em cães dos distintos grupos experimentais infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* não tratados (INT) e tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) ao longo das diferentes avaliações realizadas após o tratamento da fase aguda da infecção.



m.a.t.: meses após o tratamento; D.O.: densidade óptica; CN: controle negativo; CP: controle positivo; BZ: grupo tratado com benznidazol; ITRA: grupo tratado com itraconazol; BZ+ITRA: grupo tratado com benznidazol e itraconazol.

5.3.4 Avaliação Parasitológica Molecular (qPCR) de tecido cardíaco

Todas as amostras controle positivas amplificaram corretamente o gene endógeno (GAPDH) do cão, o que confirma a qualidade da preparação do DNA e permite a credibilidade nos dados obtidos.

As avaliações do parasitismo tecidual pela técnica parasitológica molecular quantitativa de PCR nos fragmentos cardíacos AD e VE estão expressas na **Tabela 4**, e foram quantificadas por parasitos em ng de DNA total. Foi observado qPCR negativa em todos os grupos, sendo esta negatividade similar e mais elevada nos grupos BZ (67%), grupo BZ+ITRA (60%) e grupo ITRA (25%).

Tabela 4 - Resultados da técnica parasitológica molecular de qPCR na avaliação pós eutanásia (18 m.p.t.) em fragmentos cardíacos de cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* tratados por via oral durante a fase aguda da infecção.

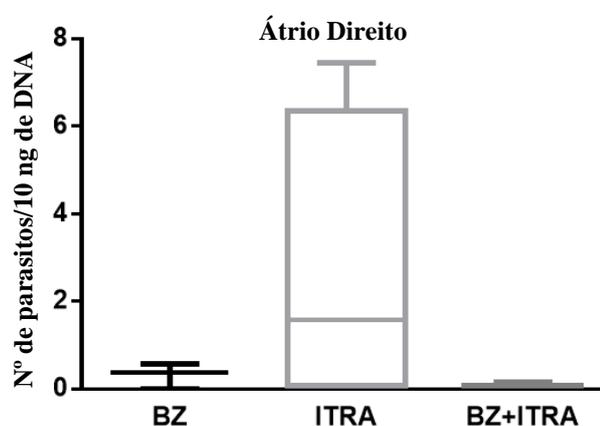
Grupos (n= 18)	Positiva (%) (n° positivos/n° animais)	Negativa (%) (n° negativos/n° animais)
BZ (n = 3)	33% (1/3)	67% (2/3)
ITRA (n = 4)	75% (3/4)	25% (1/4)
BZ+ITRA (n = 5)	40% (2/5)	60% (3/5)

n: de número de animais; n°: número; BZ: benznidazol; ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol; *p≤ 0,05.

A qPCR no coração (AD e VE) apresentou resultado negativo em dois animais (cães B1e B3) tratados com BZ, em um animal (cão B4) tratado com ITRA e em três animais (cães B2, B7 e B8) tratados com a associação BZ+ITRA. Estes resultados são também contraditórios a ambos, ao conjunto de métodos parasitológicos e a interpretação do resultado dos tratamentos segundo o critério de cura do MS (2012).

Tendo em vista esta contradição foi feita a avaliação da carga parasitária comparativa dos animais tratados expressa em ng de DNA do parasito obtidas na qPCR. A avaliação do átrio direito (AD) revelou carga parasitária mais reduzida foi no grupo tratado com a associação BZ+ITRA, seguido do grupo tratado com BZ e depois do grupo tratado com ITRA, mas estas diferenças não foram significativas devido ao pequeno número de animais dos grupos tratados com BZ (n= 3) e ITRA (n= 4) e ao grande desvio padrão entre os níveis de DNA de animais de um mesmo grupo experimental.

Figura 4 - Carga parasitária no átrio direito de cães infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* e tratados com BZ, ITRA e BZ+ITRA na fase aguda da infecção. Os valores são expressos com mediana (IQ 25-75%).

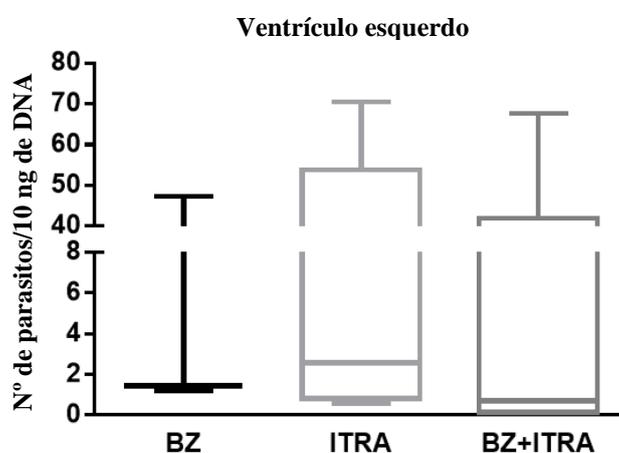


N°: número; BZ: benznidazol, ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol.

A análise da qPCR no ventrículo esquerdo (VE) mostrou que a carga parasitária seguiu a mesma tendência dos resultados dos dados obtidos no átrio direito (BZ+ITRA < BZ < ITRA) e que as diferenças entre os grupos também não foram significativas, o que pode ser explicado pelas mesmas razões já descritas acima.

Considerados conjuntamente, os dados sugerem que a redução da carga parasitária nos dois fragmentos cardíacos parece ser maior devido ao tratamento com BZ uma vez que em ambos ela foi maior nos animais tratados com ITRA.

Figura 5 - Carga parasitária no ventrículo esquerdo de cães infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* e tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) na fase aguda da infecção. Os valores são expressos em mediana (IQ 25-75%).



Nº: número; BZ: benznidazol, ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol.

A **Tabela 5** mostra a carga parasitária de *T. cruzi* individual dos cães submetidos aos diferentes tratamentos, BZ, ITRA e BZ+ITRA, após 18 meses.

Sendo o ponto de corte de 3 ng de DNA, os resultados revelam um aspecto que merece ser destacados, a grande diferença da carga parasitária entre os fragmentos do AD e VE de um mesmo cão, algumas vezes sendo o resultado negativo em um e positivo em outro com carga parasitária bem elevada (assinalados em roxo), o que resulta na interpretação conjunta dos dois fragmentos como um animal positivo na qPCR.

Foi verificado ainda que alguns animais positivos apresentaram carga parasitária ligeiramente mais elevadas do que o ponto de corte (assinalados em verde).

Tabela 5 - Carga parasitária em cães infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* 18 meses pós-tratamento da fase aguda com BZ, ITRA e a associação BZ+ITRA.

Grupos	Animais	Concentração de DNA (ng)		Interpretação (AD+VE)
		Átrio Direito (AD)	Ventrículo Esquerdo (VE)	
Benzimidazol (BZ)	B1	0,002	1,189	N
	B3	0,572	1,432	N
	B6	0,374	47,252	P
Itraconazol (ITRA)	B4	0,000	0,570	N
	B5	7,450	70,468	P
	M3	3,048	1,525	P
	M6	0,060	3,622	P
BZ+ITRA	B2	0,021	0,003	N
	B7	0,011	0,296	N
	B8	0,024	0,702	N
	M2	0,043	67,641	P
	M5	0,144	16,093	P

N: negativo; P: positivo; ng: nanograma.

5.5 Sobrevida dos animais

Não houve mortalidade decorrente da infecção, mas ocorreram três mortes acidentais antes de iniciar o tratamento e uma depois da primeira avaliação (30 dias pós tratamento), devido a brigas entre os animais, impedindo assim a comparação com os grupos tratados ao longo das avaliações realizadas.

5.6 Interpretação da Cura

A interpretação da cura dos animais está apresentada na **Tabela 6** que apresenta o resultado de todos os testes em todas as avaliações realizadas.

Tabela 6 - Avaliações pós-tratamento e eficácia terapêutica do BZ, ITRA e associação de BZ+ITRA em cães infectados com a cepa VL-10 *T. cruzi* tratados na fase aguda da infecção.

Grupos Animais		Métodos Parasitológicos								Sorologia convencional				Interpretação da Cura		qPCR no coração (AD e VE)
		Hemocultura (m.a.t.)				PCR (m.a.t.)				ELISA (m.a.t.)				Última avaliação	Todas as avaliações	
		1	6	12	18	1	6	12	18	1	6	12	18	Somente Testes Parasitológicos	MS (2016)	
Benznidazol (BZ)	B1	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	P	P	NC	N
	B3	N	N	P	N	N	N	N	P	N	P	P	P	P	NC	N
	B6	N	N	N	N	P	N	P	N	P	P	P	P	P	NC	P
	M1	-	#	#	#	-	#	#	#	+	#	#	#	#	#	#
Itraconazol (ITRA)	B4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	NC	N
	B5	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	NC	P
	M3	N	P	N	N	N	N	P	N	P	P	P	P	P	NC	P
	M6	N	N	P	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P	NC	P
BZ + ITRA	B2	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	NC	N
	B7	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	NC	N
	B8	N	N	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	P	C	N
	M2	N	N	P	N	N	N	P	P	N	P	P	P	P	NC	P
	M5	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	P	P	NC	P

HC: hemocultura; PCR: reação em cadeia da polimerase; ELISA: "enzyme-linked-immunosorbent-assay"; m.a.t.: meses após tratamento; P: positivo; N: negativo; C: curado; NC: não curado; #: Morte do cão; qPCR: PCR em tempo real no coração, AD: átrio direito; VE: ventrículo esquerdo.

Levando em consideração todos os exames realizados em todas as avaliações (HC, PCR em eluato sanguíneo e ELISA), nenhum animal foi curado de acordo com o critério clássico de cura (MS 2016). No entanto, se o critério mais atual do que o clássico for considerado, um animal (cão B8) tratado com BZ+ITRA está/foi curado na última avaliação por ter apresentado resultados negativos em todas as avaliações realizadas, incluindo a sorologia convencional (ELISA), considerada padrão ouro de cura na avaliação pós-tratamento.

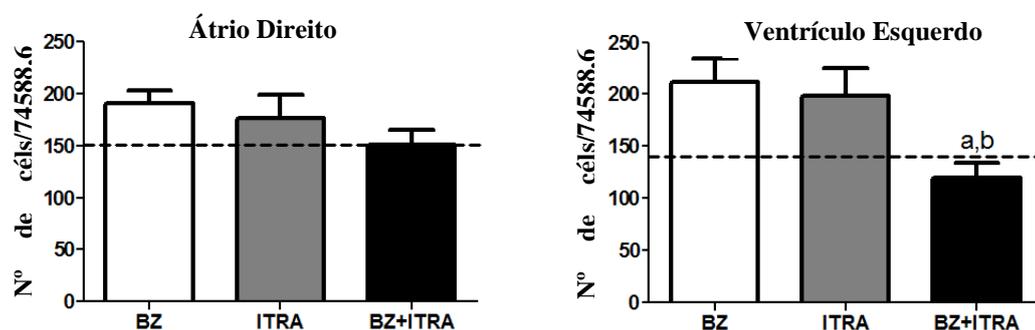
Pode ser verificada a grande contradição entre os resultados dos exames parasitológicos da última avaliação (18.m.p.t) com as avaliações sorológicas deste mesmo tempo, e inclusive com as demais. Dois animais, um (cão B4) do grupo ITRA e outro (cão B7) do grupo (BZ+ITRA) em nenhuma das avaliações apresentaram métodos parasitológicos positivos, apenas sorologia positiva convencional durante todo o período de avaliação. Estes animais podem ser considerados curados de acordo com os critérios alternativos (KRETTLI e BRENER, 1982; LANA e MARTINS-FILHO, 2015).

A qPCR no coração (AD e VE) apresentou resultado negativo em dois animais (cães B1 e B3) do grupo BZ, em um animal (cão B4) do grupo ITRA e em três animais (cães B2, B7 e B8) do grupo BZ+ITRA. Estes resultados são também em parte (5/12 animais) contraditórios a ambos, ao conjunto de métodos parasitológicos e a interpretação do resultado dos tratamentos segundo o critério de cura do MS (2016).

5.6.1 Avaliações histopatológicas por *hematoxilina & eosina (H&E)*

A presença de amastigotas não foi observada nas avaliações histopatológicas. Em relação à inflamação, no átrio direito, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. No entanto, a análise qualitativa mostrou a presença de um infiltrado inflamatório moderado em todos os animais tratados apenas com BZ. Por outro lado, observou-se uma redução significativa do processo inflamatório no ventrículo esquerdo, entre os animais tratados com a associação BZ+ITRA em comparação aos animais tratados em monoterapia com BZ e ITRA (**Figura 6**).

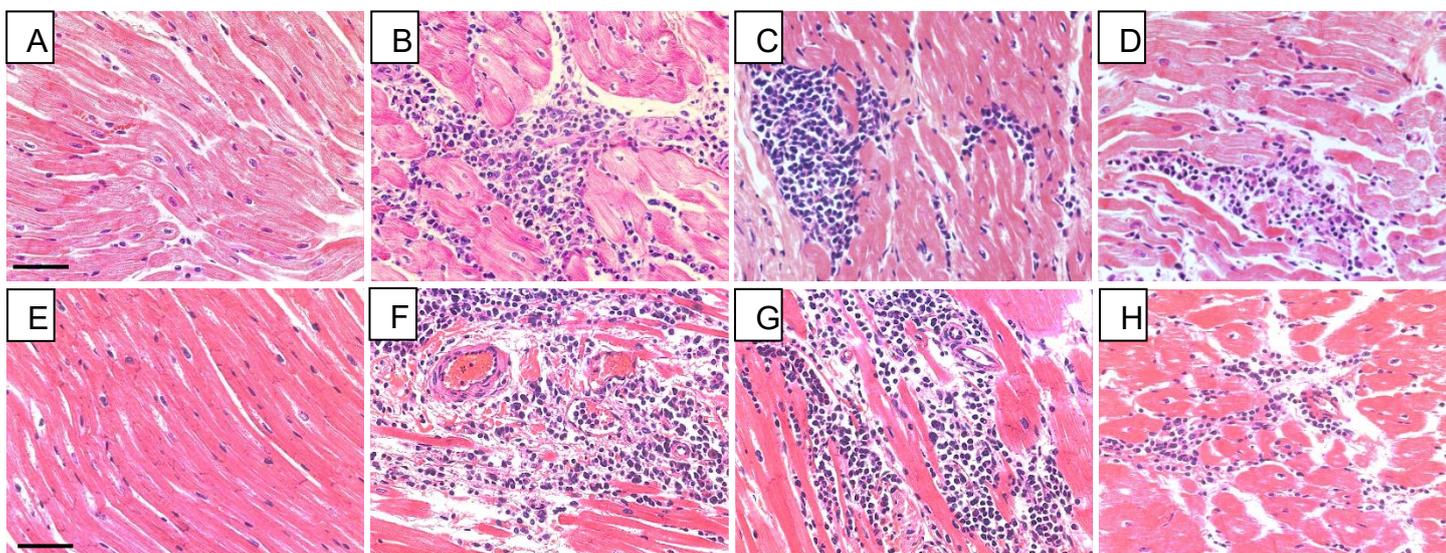
Figura 6 - Análise morfométrica do átrio direito e do ventrículo esquerdo mostrando o número de células inflamatórias na coloração por H&E em cães experimentalmente infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* no 18º mês após o tratamento com a associação BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA).



Nº: número; céls: células; BZ: benznidazol; ITRA: itraconazol; BZ+ITRA: benznidazol associado ao itraconazol; a,b: estatística.

Os resultados são expressos como número médio de núcleo de células inflamatórias \pm erro padrão. As diferenças ($p < 0,05$) são realçadas pela letra "a" entre os grupos BZ e BZ+ITRA, e "b" entre os grupos ITRA e BZ+ITRA. A linha pontilhada representa o número médio de células no AD e VE de cães controle não infectados.

Figura 7 - Fotomicrografias de infiltrados inflamatórios nos átrio direito e ventrículo esquerdo de cães tratados com BZ, ITRA e sua associação (BZ+ITRA) e grupo controle INT durante a fase aguda da infecção com a cepa VL-10 de *T. cruzi* após 18 meses de tratamento.



(A) e (E) padrão histológico normal do átrio direito e ventrículo esquerdo, respectivamente, de animais não infectados; (B) e (C) infiltrado inflamatório moderado observado no átrio direito de animais dos grupos BZ e ITRA, respectivamente; (D) infiltrado inflamatório discreto no átrio direito dos animais tratados com a associação BZ + ITRA; (F e G) infiltrado inflamatório intenso no ventrículo esquerdo dos grupos BZ e ITRA, respectivamente. (H) infiltrado inflamatório discreto no ventrículo esquerdo do grupo BZ + ITRA. Hematoxilina-Eosina, Barra= 50 μ m.

6 DISCUSSÃO

Desde a descoberta da DCh (CHAGAS, 1909), pesquisadores buscam por uma terapia medicamentosa ideal para o seu tratamento, e atualmente, apenas o BZ encontra-se disponível no Brasil. Devido as limitações relacionados ao BZ, como os efeitos adversos e baixa eficácia, a busca por fármacos mais eficazes tornou-se um desafio, mesmo sendo BZ considerado o melhor fármaco para esta enfermidade até o momento (FARIAS *et al.*, 2006). Tendo em vista o fracasso dos compostos avaliados recentemente, principalmente dos derivados azólicos, a associação de fármacos *anti-T.cruzi*, tem sido recomendada como perspectiva na quimioterapia de diversas patologias/infecções, inclusive a DCh.

A proposta deste estudo foi avaliar a ação terapêutica do BZ quando associado ao ITRA em paralelo a cada um deles isoladamente, no tratamento da infecção experimental de fase aguda da DCh em cães infectados com a cepa VL-10 *T. cruzi* resistente ao tratamento com BZ neste modelo animal (CALDAS, 2011).

Antes do tratamento, a infecção foi confirmada pelo método parasitológico ESF em todos os animais inoculados como demonstrado anteriormente no estudo de Caldas (2011) em modelo cão em condições semelhantes. Os mais importantes resultados foram a demonstração de que parasitemia ou ASC e o período da patente (PP) foram significativamente menores nos animais do grupo BZ e BZ+ITRA do que no grupo controle (INT), e que o grupo ITRA também apresentou redução significativa da parasitemia em relação aos do grupo controles. Esses resultados sugerem atividade de todos os tratamentos contra *T. cruzi*, o que já foi demonstrado por Caldas, (2011) com BZ em cães. Verificou-se ainda que a ação de BZ e ITRA e da associação de BZ+ITRA, no mesmo regime terapêutico por 60 dias, levaram à supressão definitiva da parasitemia durante todo o tratamento e após o seu término, diferentemente do observado por Caldas (2008) e Caldas (2011) em cães quando estes autores verificaram que a parasitemia aumentou (ESF e qPCR de sangue positivos) após tratamento com ITRA e BZ quando tratados em doses mais elevadas (100mg/kg/dia) durante 20 dias consecutivos. Nossos dados são semelhantes aos de (GUEDES *et al.*, 2002), que obtiveram um curto período patente (1-3 dias) depois de iniciar o tratamento de fase aguda com BZ em cães infectados com as cepas Colombiana, Y e Be-78 de *T. cruzi*,

consideradas resistente, parcialmente resistente e susceptível, respectivamente, ao tratamento com BZ.

Quando a hemocultura foi utilizada ao longo de 18 meses após o tratamento, revelou-se falha do tratamento em 33% a 50% dos animais nos três grupos tratados), mesmo considerando que a sensibilidade deste método é menor do que o observado em outros métodos parasitológicos realizados em paralelo, a exemplo da PCR em modelos animais recentemente tratados (GUEDES *et al.*, 2002, 2004, DINIZ *et al.*, 2010) ou humanos (GALVÃO *et al.*, 2003; MACHADO-DE-ASSIS *et al.*, 2012). Foi ainda demonstrado que a PCR de sangue realizada em paralelo foi negativa em 0% a 25% destes mesmos grupos de cães tratados. Os resultados negativos de hemocultura (50 a 67%) e PCR (0 a 25%) nas avaliações pós-tratamento foram semelhantes em todos os grupos tratados e ambos revelaram discreta redução da infecção e/ou carga parasitária.

Considerando conjuntamente HC e PCR, dos três animais tratados por BZ um foi positivo na HC e todos apresentaram positividade na PCR nas três últimas avaliações, diferente dos animais do grupo ITRA e BZ+ITRA, nos quais um animal de cada grupo (cães B4 e B7 respectivamente) apresentaram todas as avaliações parasitológicas negativas. Estes resultados diferem dos obtidos por Guedes *et al.* (2002), que observaram 100% de positividade nas avaliações parasitológicas dos animais tratados com BZ e infectados pelas cepas Colombiana de *T. cruzi* e VL-10, ambas resistentes ao BZ, diferente também do obtido com a cepa Y de *T. cruzi*, que se apresenta parcialmente resistente ao tratamento em modelo murino, cujos animais apresentaram total negatificação das avaliações parasitológicas, também confirmada por Caldas (2008) nas mesmas condições experimentais. Este autor também avaliou cães infectados com a cepa VL-10 tratados com BZ e obteve 75% de hemoculturas positivas enquanto neste trabalho 33% dos animais foram negativos. Em relação a PCR ela foi positiva em 100% dos animais, assim como neste trabalho.

O teste sorológico ELISA foi negativo em alguns animais na primeira avaliação (primeiro mês após o tratamento), provavelmente devido ao primeiro impacto e ação direta dos tratamentos sobre a parasitemia dos animais, como demonstrado por outros autores em cães tratados (CALDAS, 2008), incluindo Caldas (2011) que tratou o modelo murino infectado com esta mesma cepa de *T. cruzi*. Posteriormente, as avaliações com ELISA revelaram resultados positivos em todos os animais de todos os grupos experimentais, devido ao estabelecimento da resposta imune humoral aos

parasitas restantes. Somente na última avaliação, no 18º mês após o tratamento, um cão (cão B8) do grupo tratado com BZ+ITRA foi negativo, sugerindo a cura deste animal pelos critérios MS (2102) e (LANA e MARTINS-FILHO, 2015), pois os testes parasitológicos também foram negativos nesta avaliação. No entanto, a PCR de sangue deste animal foi positiva em duas avaliações anteriores. Conseqüentemente, este cão é considerado não curado pelos critérios clássicos de cura tomando em consideração a avaliação global (CANÇADO, 2002; WHO, 2002). Guedes *et al.* (2002) também verificaram que cães infectados com as cepas Colombiana e Be-78 tratados com BZ e resistentes a este fármaco neste modelo animal, apresentaram ELISA positiva ao contrário dos animais infectados pela cepa Y que se mostraram sensíveis ao tratamento. O mesmo foi observado por Caldas (2008), que também encontrou 100% de negatividade na sorologia convencional em animais infectados pela cepa Y e 100% de positividade em animais infectados pela cepa VL-10 tratados com BZ. Conjuntamente, nossos resultados e estes últimos trabalhos citados sobre quimioterapia nos modelos cão e murino demonstram a influência da cepa de *T. cruzi* e do modelo animal na resposta ao tratamento uma vez que as cepas Be-78 e Y, sensível e parcialmente sensível ao BZ no modelo camundongo apresentaram-se resistente e sensível, respectivamente, a este fármaco no modelo cão.

Embora a reatividade dos testes sorológicos não seja considerada como um marcador ideal para a eficácia do tratamento na DCh, devido a várias outras razões, além da presença de infecção por *T. cruzi*, que também são responsáveis pela manutenção da sorologia positiva (KRETTLI, 2009) foi feita a qPCR no tecido cardíaco e avaliações histopatológicas do coração na análise final dos animais (18º m.p.t.) após a necropsia, em paralelo com as avaliações anteriores, para melhor conhecer os resultados da qPCR de tecido no contexto das outros testes laboratoriais realizados na avaliação pós-tratamento dos animais e o impacto desses tratamentos no processo inflamatório cardíaco e na fibrose. Em nossas condições experimentais a técnica de qPCR é de alta sensibilidade (97,5%). Essas avaliações em tecidos revelam DNA de parasitas de outro compartimento hospedeiro (tecido cardíaco) e forma evolutiva de *T. cruzi* (amastigotas) presentes no interior das células.

Os resultados encontrados na análise conjunta dos dois fragmentos (AD e VE) cardíacos revelaram que dois animais do grupo BZ (cão B1 e cão B3), um do grupo ITRA (cão B4) e três tratados com a associação destes fármacos (cães B2, B7 e B8)

foram negativos, sugerindo maior redução da carga parasitária cardíaca em relação ao verificado por Caldas *et al.* (2012) e Caldas *et al.* (2014) em modelo murino infectado com a cepa VL-10 que foram sempre apresentaram a qPCR positiva. Os resultados da qPCR aqui obtidos foram em parte discordantes dos resultados dos outros testes parasitológicos (HC e PCR no eluato de sangue). A explicação para estas discrepâncias merece ser bem discutida. Em primeiro lugar, a divergência de resultados entre os dois fragmentos de um mesmo órgão e animal indica que a qPCR feita em amostras de biópsias de hospedeiros de grande porte como cão e possivelmente em humanos não são representativas do todo e que, portanto, esta técnica não se aplica à avaliação pós-tratamento destes hospedeiros, diferentemente do observado em camundongos, modelo de pequeno porte (ASSIRIA-MARTINS, 2015; BAZÁN *et al.*, 2016). Em segundo lugar, é necessário ter em mente que a positividade deste teste pode indicar DNA de parasitas mortos e/ou vivos, e que o tempo necessário para que o DNA de parasitas mortos desapareça dos tecidos é desconhecido, diferentemente do já observado no compartimento do sangue onde a sua permanência, pelo menos no modelo murino, é de aproximadamente 48 horas (TARLETON e ZHANG, 1999). Para ilustrar esta possibilidade, já foi demonstrado por nosso grupo (MARTINS *et al.*, 2008) que a PCR em tecido de camundongos, considerados curados pelos critérios clássicos de cura da doença de Chagas foi positiva como também demonstrado por (MICHAILOWSKY *et al.*, 1998), e que possivelmente esteja detectando DNA de parasitas mortos remanescente nos tecidos. Quanto aos nossos resultados, entendemos a que qPCR de tecido com concentração de DNA ligeiramente maior do que o ponto de corte pode não ser interpretado como presença real de infecção por *T. cruzi* (parasitas vivos no tecido), e isto ocorreu em vários animais. Devido a estes achados, em seguida, a redução da concentração de DNA foi considerada para uma análise mais real desta metodologia no contexto da avaliação pós-tratamento. Esta análise demonstrou, tanto no átrio direito como no átrio esquerdo, que a carga parasitária foi menor no grupo tratado com a associação BZ+ITRA, seguido do grupo tratado com BZ e do tratado com ITRA, sendo as diferenças não significativas.

Considerados conjuntamente, os dados sugerem que a redução da carga parasitária nos dois fragmentos cardíacos parece ser maior devido ao tratamento com BZ, uma vez que em ambos ela foi maior nos animais tratados com ITRA. Isto pode estar corroborando os resultados de MOREIRA *et al.* (2012) que demonstraram que o BZ na presença do ITRA melhorou significativamente sua farmacocinética

permanecendo por muito mais tempo e em maior concentração no plasma dos camundongos tratados. Nosso estudo irá avançar ainda na avaliação da farmacocinética no modelo cão dos dois fármacos (BZ e ITRA) em doses isoladas e múltiplas, bem como em associação. Esta melhoria na farmacocinética observada por MOREIRA *et al.* (2012) sugere que o encontro de melhores índices de cura dos animais infectados com clones de grupos genéticos (DTUs I, II e híbrido TcV) distintos tratados na fase aguda da infecção (MOREIRA, 2011) em modelo murino.

Infelizmente, as amostras de sangue dos cães não foram recolhidas em paralelo para serem analisadas por esta técnica. A qPCR na amostra de sangue, embora possa revelar a presença de DNA de parasitas vivos e/ou mortos, derivados principalmente de tripomastigotas de sangue, ela falha na detecção de DNA dos amastigotas no tecido (CALDAS *et al.*, 2014). Por estas razões, recentemente, Bázan *et al.* (2016) analisaram a queda da carga parasitária na qPCR em amostras de sangue de camundongos tratados e verificaram que ela foi significativamente mais baixa que o observado em animais não tratados, mas não totalmente eliminada, mesmo em animais negativos na ELISA e curados parasitologicamente. Novamente a mesma questão permanece para a qPCR feita em tecido. Esta leve presença de DNA é devida aos parasitos vivos remanescentes ou parasitas mortos? Infelizmente, os animais do grupo controle do presente estudo não foram examinados em paralelo devido à morte antecipada, o que poderia mostrar melhor o impacto do tratamento nestas avaliações. O que se verificou em relação a qPCR em tecido é que esta metodologia apesar da alta especificidade e sensibilidade, ela não pode ser usada isoladamente na avaliação pós-tratamento e que sua positividade em níveis muito próximos ao ponto de corte não pode ser interpretada como indicativa de presença de infecção ativa por *T. cruzi*.

Na análise global da interpretação da cura pelos critérios mais atuais e considerando apenas os dados parasitológicos, foi verificado que um animal tratado com ITRA (cão B4) e um tratado com BZ+ITRA (cão B7) poderiam ser considerados como curados. Inclusive um deles, o cão B7, apresentou na última avaliação uma ligeira queda de reatividade sorológica no teste de ELISA. No entanto, a sorologia convencional mostrou resultados negativos indicativos de cura apenas em um animal (cão B8), e uma das razões pode ser porque os animais foram necropsiados mais cedo do que o tempo necessário para a redução significativa dos títulos sorológicos. É importante destacar ainda, que foi utilizado como antígeno para o teste ELISA

preparação alcalina de todo o parasito, enquanto alguns autores demonstraram diminuição ou negatificação do teste ELISA usando antígenos recombinantes específicos denominado F29 e F13 (FABBRO *et al.*, 2013; BÁZAN *et al.*, 2016) derivados de frações do parasito, em tempo curto de avaliação, inclusive em humanos.

Em conjunto, os resultados obtidos indicam uma melhor atividade terapêutica na associação de BZ+ITRA, seguida do grupo tratado com BZ e ITRA, tais como: (i) maior redução da parasitemia no exame de sangue a fresco, (ii) maior redução da reatividade sorológica, (iii) maior negatividade na qPCR no coração e (iv) maior redução da inflamação cardíaca, fatores indicativos de atividade terapêutica. Como ambos os fármacos já são utilizados em humanos para o tratamento da doença de Chagas e micoses, esses resultados preliminares podem estimular estudos futuros. Infelizmente, verificamos que a positividade de HC e principalmente de PCR ao longo de todas as avaliações pós-tratamento aumentaram, sugerindo que mais tempo de avaliação seria necessário para a confirmação de cura dos animais sempre negativos nestes métodos parasitológicos (cães B4 e B7) e/ou na ELISA (cão B8).

Dando prosseguimento a este estudo estamos avaliando cães nas mesmas condições e tratados na fase crônica para uma melhor avaliação desses mesmos tratamentos. Nestes animais eletrocardiograma e do ecocardiograma foram incorporadas para melhor verificação do impacto do tratamento na evolução clínica da doença.

As análises histopatológicas revelaram impacto positivo dos tratamentos sobre o processo inflamatório, principalmente no ventrículo esquerdo, onde o número de células inflamatórias foi significativamente maior nos animais tratados com BZ, seguidos pelos tratados com ITRA e BZ+ITRA, respectivamente. Quanto à fibrose, a tendência de sua intensidade nos diferentes grupos tratados foi a mesma observada na inflamação sugerindo que o tratamento ao reduzir a inflamação a mesma é substituída pela fibrose em intensidade proporcional, a mais grave lesão encontrada na cardiopatia chagásica. Este achado poderia explicar, pelo menos em parte, o fracasso dos resultados obtidos no projeto BENEFIT (MOLINA *et al.*, 2016) quando pacientes cardiopatas crônicos foram tratados com BZ. Este resultado também demonstra o que já foi verificado experimentalmente no modelo cão por (CALDAS *et al.*, 2012). Juntos estes trabalhos demonstram que a fibrose pode ser uma característica intrínseca da cepa VL-10, pertencente à DTU II tão presentes no Brasil Central e Cone Sul (ZINGALES *et al.*, 2012), onde as mais graves alterações clínicas são observadas nos pacientes

(MACEDO, 2010; RASSI *et al.*, 2010) e associadas às formas clínicas cardíaca e digestiva na DCh.

Resultados equivalentes foram observados por Caldas (2008) no mesmo modelo experimental, e cepa de *T. cruzi* quando tratados com BZ em modelo murino tratado com BZ, posaconazol, fexinidazol e ITRA (CALDAS, 2011; ASSIRIA-MARTINS *et al.*, 2015). No entanto, Caldas (2008) observou que os cães infectados pela cepa VL-10 de *T. cruzi* e tratados com BZ não apresentaram redução da inflamação, diferentemente dos animais inoculados com a cepa Y. *T. cruzi*, sensível ao tratamento neste modelo, que apresentaram a inflamação. O BZ também levou à redução da inflamação e alterações eletrocardiográficas em humanos (FABBRO *et al.*, 2007; VIOTTI *et al.*, 2011), embora existam controvérsias entre os autores (CASTRO *et al.*, 2005; MACHADO-ASSIS *et al.*, 2013). O acompanhamento dos paciente tratados com ITRA por Apt *et al.* (2003) e Apt *et al.* (2013) também revelou impacto positivo equivalente deste tratamento. Toledo *et al.* (2003) ao avaliarem a susceptibilidade de clones de *T. cruzi* pertencentes à DTU TcII (assim como a cepa VL-10) ao tratamento com ITRA, detectaram taxas de cura de 42,1% na fase aguda e de 76,74% na fase crônica da infecção em camundongos, diferentemente do observado na fase aguda onde nenhum animal tratado com BZ e infectado com clones da DTU TcI foi curado.

A redução da inflamação nos dados histopatológicos em animais tratados e humanos é interpretada como consequência da redução da parasitemia e tem sido observada tanto em hospedeiros curados quanto em não curados (APT *et al.*, 2013; CALDAS *et al.*, 2014; VIOTTI *et al.*, 2011). Em conjunto, a atividade terapêutica e os benefícios verificados nas lesões cardíacas, principalmente do tratamento BZ+ITRA, seguido do ITRA isolado, indicam que os clínicos podem explorar essas possibilidades no tratamento da doença de Chagas, uma vez que ambos os fármacos já são utilizados em humanos.

O mecanismo de ação do BZ não é completamente conhecido (URBINA e DOCAMPO, 2003). Recentemente veem sendo contraditoriamente propostos dois possíveis mecanismos de ação pelos quais o BZ exerce seu efeito anti-*T. cruzi*: ou pela ação da enzima nitroreductase tipo I, liberando glioxal, um composto altamente tóxico ao *T. cruzi*, ou pela glutatona, alterando os sistemas antioxidantes do parasito (KEENAN e CHAPLIN, 2015). O ITRA é rapidamente convertido via citocromo P3A4 (CYP3A4) em metabólito ativo anti-*T. cruzi*, o hidroxitraconazol (HITZ). Além disso, estudos in

vitro e in vivo mostram que o ITRA e HIZ são potentes inibidores da enzima metabolizadora CYP3A4 e da enzima de transporte P-gp, o que pode contribuir na modificação das propriedades farmacocinéticas dos fármacos considerados seus substratos, como o BZ (TATEISHI *et al.*, 2008; YAO e SRINIVAS, 2009). As limitações da ação anti-*T. cruzi* destes compostos pode ser devida à inadequação dos seus parâmetros farmacocinéticos quando utilizados isoladamente. Assim, este estudo está em andamento em relação a dois aspectos importantes: a avaliação dos mesmos tratamentos em cães na fase crônica da infecção e da farmacocinética de cada um dos fármacos utilizados em doses únicas e múltiplas e em associação (BZ+ITRA).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- I. A atividade terapêutica em cães infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* e tratados durante a fase aguda da doença foi melhor no grupo que recebeu a associação de BZ+ITRA, seguida do grupo tratado com ITRA e BZ, respectivamente. De acordo com o critério de cura estabelecido pelo MS (2012), um animal (cão B8) que foi tratado com BZ+ITRA, parece estar curado, pois apresentou na sua última avaliação (18 m.p.t.) resultados negativos nos testes parasitológicos e na ELISA.
- II. A melhor atividade terapêutica está relacionada a uma maior redução da parasitemia no ESF, maior redução da reatividade sorológica, maior negatividade na qPCR no coração e maior redução da inflamação cardíaca.
- III. Houve uma oscilação na positividade dos testes parasitológicos de sangue ao longo de todas as avaliações, sugerindo que mais tempo e avaliações seriam necessárias para uma melhor avaliação dos animais em relação a cura parasitológica e evolução clínica.
- IV. A qPCR em fragmento de tecido não se aplica ao controle de cura para animais de grande porte como o cão, e níveis de positividade muito próxima ao ponto de corte não pode ser interpretada como indicativa segura da presença de infecção ativa por *T. cruzi*.

8 CONCLUSÃO

A associação dos fármacos BZ e ITRA no tratamento da infecção aguda de cães infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* pareceu ser promissora, visto que os resultados foram melhores nos testes parasitológicos, sorológico e histopatológico em relação aos grupos de animais tratados com estes mesmos fármacos em monoterapia; além do mais, a redução da inflamação no coração e conseqüentemente da fibrose, observadas nos animais do grupo BZ+ITRA, sugere que esta associação de tratamento deve ser explorada.

9 PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectiva a avaliação da associação BZ+ITRA e destes fármacos isolados na fase crônica da DCh em cães infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi*, e análise dos parâmetros farmacocinéticos, os quais também podem auxiliar na compreensão dos resultados já obtidos de tratamento da fase aguda da doença.

10 REFERÊNCIAS

ANDRADE, Ana Lúcia S. S.; ANDRADE, Celina; MARTELLI, M. T.; OLIVEIRA, Renato M.; SILVA, Simone A.; AIRES, Andréa, I. S.; SOUSSUMI, Lea M. T.; COVAS, Dimas T.; SILVA, Luiz S.; ANDRADE, João G.; TRAVASSOS, Luiz R.; ALMEIDA, Igor C. **Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six-year follow-up.** Am J Trop Med Hyg, v. 71, n. 5, p. 594-7, Nov 2004.

ANDRADE, Sônia G.; MAGALHÃES, Juracy B. **Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology.** Rev Soc Bras Med Trop, v. 30, n. 1, p. 27-35, Uberaba, Jan-Feb 1996.

ANDRADE, Zilton A. **The canine model of Chagas' disease.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 79, p. 77-83, 1984.

ANSELMÍ, A.; GURDIEL, O.; SUÁREZ J. A.; ANSELMÍ, G. **[Disorders of the A-V circulation system in chagasic myocarditis in dogs].** Acta Cient Venez, v. 18, p. 10, 1967.

APT, Werner; AGUILERA, Ximena; ARRIBADA, Arturo; PÉREZ, Carlos; MIRANDA, Claudio; SANCHEZ, Gittith; ZULANTAY, Inês; CORTES, Pedro; RODRIGUEZ, Jorge; JURI, Daniel. **Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol.** Am J Trop Med Hyg, v. 59, n. 1, p. 133-8, Jul 1998.

APT, Werner; ARRIBADA, Arturo; ZULANTAY, Inês; SANCHEZ, G.; VARGAS, S. L.; RODRIGUEZ, Jorge. **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, v. 97, n. 1, p. 23-29, Jan 2003.

ARAUJO, M. S.; MARTINS-FILHO, Olindo A.; PEREIRA, M. E. S.; BRENER, Zigman. **A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease.** J Antimicrob Chemother, v. 45, n. 6, p. 819-24, Jun 2000.

ASSÍRIA-MARTINS, Tassiane Fontes; DINIZ, Livia Figueirero; MAZZETTI, Ana Lia; NASCIMENTO, Álvaro Fernando da Silva; CALDAS, Sérgio; CALDAS, Ivo Santana; ANDRADE, Isabel Mayer; RIBEIRO, Isabela; BAHIA, Maria Terezinha. **Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease.** PLoS One, v. 10, n. 6, p. e0128707, 2015.

AVILA, Herbert A.; SIGMAN, David S.; COHEN, Lee M.; MILIKAN, Robert C.; SIMPSON, Larry. **Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease.** Mol Biochem Parasitol, v. 48, n. 2, p. 211-21, Oct 1991.

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

BAZÁN, Paola Carolina; LO PRESTI, María Silvina; STRAUSS, Mariana; BÁEZ, Alejandra Lidia; MILER, Noemí; PAGLINI, Patricia Adriana, RIVAROLA, Héctor Walter. **Quantitative PCR and unconventional serological methods to evaluate clomipramine treatment effectiveness in experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Experimental and Molecular Pathology, v. 101, n. 2, p. 274-280, 2016.

BOCK, M.; GONNERT, R.; HABERKORN, A. **Studies with Bay 2502 on animals.** Bol Chil Parasitol, v. 24, n. 1, p. 13-9, Jan-Mar 1969.

BRENER, Zigman. **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962.

BRENER, Zigman; CANÇADO, Joaquim Romeu; GALVÃO, Lucia Maria da Cunha; LUZ, Zélia Maria Profeta; FILARDI, Leny de Sousa; PEREIRA, Maria Elizabeth Soares; SANTOS, Luiz Mauro T.; CANÇADO, Catarina B. **An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 88, n. 1, p. 149-53, Jan-Mar 1993.

BRITTO, C.; CARDOSO M. A.; WINCKER, P.; MOREL C. M. **A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 88, n. 1, p. 171-2, Jan-Mar 1993.

CALDAS, Ivo. **Impacto do tratamento com benznidazol na evolução da doença de Chagas experimental - análise imunopatológica e funcional.** Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – CBIOL, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas - NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto/MG – UFOP, 2011.

CALDAS, Sérgio; CALDAS, Ivo Santana; CECÍLIO, Alzira Batista; DINIZ, Lívia de Figueiredo; TALVANI, André; RIBEIRO, Isabela; BAHIA, Maria Terezinha. **Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Acta tropica, v. 123, n. 3, p. 170-177, 2012.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 6, p. 93-100, May-Jun 1964.

CAMPOS, E. S. **Estudos sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*.** An. Fac. Med. São Paulo. 2 1927.

CANÇADO, J. Romeu. **Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACEDO, V. **Estudo clínico durante 13 anos de 190 chagásicos crônicos de Mambai, Goiás, Brasil**. Rev Soc Bras Med Trop, p. 309-318, 2001.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACEDO, V. **[The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas' disease]**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, n.1, p. 1-6, Jan-Feb 2005.

CASTRO, José A.; DE MECCA, María Monalto; BARTEL, Laura C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American tripanosomiasis)**. Hum Exp Toxicol 25: 471-479, 2006.

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

CHAGAS, Carlos Ribeiro Justiniano. **Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1 1909.

CHIARI, Egler; DIAS, João Carlos Pinto; LANA, Marta; CHIARI, Clea Andrade. **Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease**. Rev Soc Bras Med Trop, v. 22, n. 1, p. 19-23, Jan-Mar 1989.

COURA, José Rodrigues. **Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 4, p. 549-54, Jul 2009.

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

CUMMINGS, Kara Lara; TARLETON, Rick L. **Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR**. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 129, n. 1, p. 53-59, 2003.

DINIZ, Livia de Figueiredo; CALDAS, Ivo Santana; GUEDES, Paulo Marcos da Matta; CREPALDE, Gevam; LANA, Marta; CARNEIRO, Cláudia Martins; TALVANI, André; URBINA, Julio Alberto; BAHIA, Maria Terezinha. **Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi***. Antimicrob Agents Chemother, v. 54, n. 7, p. 2979-86, Jul 2010.

DOYLE, Patricia S.; DVORAK, James A.; ENGEL, Juan C. ***Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks**. J Protozool, v. 31, n. 2, p. 280-3, May 1984.

ELEA, L. Abarax (Benznidazol). <http://www.elea.com/es/productos/1204/354/ABARAX.htm>, 2012.

FABBRO, Dianna; VELAZQUEZ, Elsa; BIZAI, Maria Laura; DENNER, Susana; OLIVEIRA, Verónica; ARIAS, Enrique; PRAVIA, Carlos; RUIZ, Andrés M. *et al.* **Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 55, n. 3, p. 167-172, 2013.

FARIAS, Sílvia Renata Queiroz; LAVRA, Zênia Maciel; MEDEIROS, Flávia Patrícia Moraes; ROLIM-NETO, Pedro José. **Uma nova proposta terapêutica para tratamento da AIDS: da monoterapia à dose fixa combinada.** Rev. Bras. Farm. 3 2006.

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

FRANCOLINO, Sonia S.; ANTUNES, Antonio Fernandez; TALICE, Rodolfo; ROSA, Rachel; SELANIKIO, Joel; REZENDE, Joffre Marcondes; ROMANHA, Álvaro J.; DIAS, João Carlos Pinto. **New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease.** Rev Soc Bras Med Trop, v. 36, n. 1, p. 103-7, Jan-Feb 2003.

FUJITA, Osamu; SANABRIA, Luis; INCHAUSTTI, Alba; ARIAS, Antonieta R.; TOMIZAWA, Yasushi; OKU, Yuzaburo. **Animal reservoirs for *Trypanosoma cruzi* infection in an endemic area in Paraguay.** J Vet Med Sci, v. 56, n. 2, p. 305-8, Apr 1994.

GALVÃO, Lúcia M. C.; CHIARI, Egler; MACEDO, Andréa M.; LUQUETTI, Alejandro O.; SILVA, Simonne A.; ANDRADE, Ana Lúcia S. S. **PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy.** Journal of clinical microbiology, v. 41, n. 11, p. 5066-5070, 2003.

GOBLE, F. C. **Observations on experimental Chagas' disease in dogs.** Am J Trop Med Hyg, v. 1, n. 2, p. 189-204, Mar 1952.

GUEDES, Paulo Marcos da Matta; URBINA, Julio A.; LANA, Marta; AFONSO, Luis C. C.; VELOSO, Vanja Maria; TAFURI, Washington Luiz; MACHADO-COELHO, George L. L.; CHIARI, Egler; BAHIA, Maria Terezinha. **Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts.** Antimicrob Agents Chemother, v. 48, n. 11, p. 4286-92, Nov 2004.

GUEDES, Paulo Marcos da Matta; VELOSO, Vanja Maria; TAFURI, Whashington Luiz; GALVÃO, Lúcia Maria da Cunha; CARNEIRO, Cláudia Martins; LANA, Marta; CHIARI, Egler; SOARES, Killarney Ataide; BAHIA, Maria Terezinha. **The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease.** Acta Trop, v. 84, n. 1, p. 9-17, Oct 2002.

GUEDES, Paulo Marcos da Matta; VELOSO, Vanja Maria; TALVANI, André; DINIZ, Livia Figueiredo Diniz; CALDAS, Ivo Santana; DO-VALLE-MATTA, Maria A.;

SANTIAGO-SILVA, Juliana; CHIARI, Egler; GALVÃO, Lúcia Maria da Cunha; SILVA, João S.; BAHIA, Maria Terezinha. **Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs.** *Vet Immunol Immunopathol*, v. 138, n. 1-2, p. 106-13, Nov 15 2010.

GUPTA, Aditya K.; SAUDER, Daniel N.; SHEAR, Neil H. **Antifungal agents: An overview, Part II.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 30, n. 6, p. 911-933, June 1994.

GURTLER, Ricardo E. **Combining residual insecticide spraying campaigns with targeted detection and specific chemotherapy for *Trypanosoma cruzi* infection in children.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 1, n. 3, p. e168, 2007.

HOTEZ, Peter; OTTESEN, Eric; FENWICK, Alan; MOLYNEUX, David. **The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination.** *Adv Exp Med Biol*, v. 582, p. 23-33, 2006.

SCHLEMPER-JUNIOR Bruno R.; ISHIDA, Maria Márcia I.; STEINDEL, Mário; GARGIONI, Rogério. **Very stout trypomastigotes as morphological pattern of strains of *Trypanosoma cruzi* of the southern region of Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 2, p. 191-198, 1986.

KEENAN, Martine; CHAPLIN, Jason H. **Chapter Four-A New Era for Chagas Disease Drug Discovery?** *Progress in medicinal chemistry*, v. 54, p. 185-230, 2015.

KJOS, S. A.; SNOWDEN, K. F.; CRAIG T. M.; LEWIS, B.; RONALD, N.; OLSON, J. K. **Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas.** *Vet Parasitol*, v. 152, n. 3-4, p. 249-56, Apr 15 2008.

KOEBERLE, F. **Cardiopatia chagásica.** *O hospital*. 53 1958.

KRAMER JR, A. W. **Experimental Chagas disease in purebred Beagle dogs acutely infected with *Trypanosoma cruzi* (B strain).** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 5 1972.

KRETTLI, Antoniana Ursine. **The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 142-151, 2009.

LAMAS, María C.; VILLAGGI, Luciano; NOCITO, Isabel; BASSANI, Georgina; LEONARDI, Dário; PASCUTTI, Fernanda; SERRA, Esteban; SALOMÓN, Claudio J. **Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole.** *Int J Pharm*, v. 307, n. 2, p. 239-43, Jan 13 2006.

LANA, Marta ; MARTINS-FILHO, Olindo Assis. **Revisiting the posttherapeutic cure criterion in Chagas disease: time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts?** *BioMed research international*, v. 2015, 2015.

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

LANA, Marta; CHIARI, Egler; TAFURI, Washington Luis. **Experimental Chagas' disease in dogs.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 87, n. 1, p. 59-71, Jan-Mar 1992.

LANA, Marta; VIEIRA, L. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; CHIARI, Egler; VELOSO, Vanja; TAFURI, Washington Luis. **Humoral immune-response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, v. 86, n. 4, p. 471-473, Oct-Dec 1991.

LARANJA, Francisco S. [**Clinical aspects of Chagas' disease**]. Rev Bras Med, v. 10, n. 7, p. 482-91, Jul 1953.

LARANJA, Francisco S.; ANDRADE, Zilton A. [**Chronic cardiac form of chagas disease in dogs**]. Arq Bras Cardiol, v. 35, n. 5, p. 377-80, Nov 1980.

LAURIA-PIRES, Liana; BRAGA, Maria S.; NITZ, Ana C. Vexenat Nadjar; SIMÕES-BARBOSA, Augusto; TINOCO, Douglas L.; TEIXEIRA, Antonio R. L. *et al.* **Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** Am J Trop Med Hyg, v. 63, n. 3-4, p. 111-118, Sep-Oct 2000.

LUMB, George; SHACKLETT, R. S.; DAWKINS, W. A. **The cardiac conduction tissue and its blood supply in the dog.** Am J Pathol, v. 35, n. 3, p. 467-87, May-Jun 1959.

MACEDO, Andréa M. **American Trypanosomiasis Chagas Disease - One Hundred Years of Research**. First. Holanda: 2010.

MACHADO-DE-ASSIS, Girley Francisco; SILVA, A. R.; DO BEM, Víctor Antônio Lemos; BAHIA, Maria Terezinha; MARTINS-FILHO, Olindo Assis; DIAS, João Carlos Pinto; ALBAJAR-VIÑAS, Pedro; TORRES, Rosália Moraes; LANA, Marta. *et al.* **Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 19, n. 8, p. 1283-1291, 2012.

MALTOS, Kátia L. M.; MENEZES, Gustavo B.; CALIARI, Marcelo V.; ROCHA, Orivaldo A.; SANTOS, Júlia M. M.; ALVES, Dalton, L. F.; DUARTE, Igor D. G.; FRANCISCHI, Janetti N. **Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp.** Archives of oral biology, v. 49, n. 6, p. 443-450, 2004.

MARTINS, Helen Rodrigues; FIGUEIREDO, Lilian Moreira.; VALAMIEL-SILVA, Jaqueline Carla de Oliveira; CARNEIRO, Cláudia Martins; MACHADO-COELHO, George Lins L.; VITELLI-AVELAR, D. M.; BAHIA, Maria Terezinha; MARTINS-FILHO, Olindo Assis. MACEDO, Andrea Mara; LANA, Marta. **Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and**

serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 61, n. 6, p. 1319-1327, 2008.

MICHAILOWSKY, Vladimir; MURTA, Silvane M. F.; CARVALHO-OLIVEIRA, Leonardo; PEREIRA, Maria E. S.; FERREIRA, Ludmila, R. P.; BRENER, Zigman; ROMANHA, Álvaro J.; GAZZINELLI, Ricardo T. **Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 42, n. 10, p. 2549-2556, 1998.

MIROWSKI, M.; LAU, Sun h.; BOBB, Gustavus A.; STEINER, Charles; DOMOTO, Anthony N. **Studies on left atrial automaticity in dogs.** Circ Res, v. 26, n. 3, p. 317-25, Mar 1970.

MOLINA, Israel; SALVADOR, Fernando; SANCHEZ-MONTALVA, Adrián. **The use of posaconazole against Chagas disease.** Curr Opin Infect Dis, v. 28, n. 5, p. 397-407, Oct 2015.

MOLINA, Judith; URBINA, Julio; GREF, Ruxandra; BRENER, Zigman; RODRIGUES-JÚNIOR, José Maciel. **Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole DO870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly lactide nanospheres.** J Antimicrob Chemother, v. 47, n. 1, p. 101-4, Jan 2001.

MOREIRA-DA-SILVA, Rodrigo Moreira; OLIVEIRA, Líliam Teixeira; BARCELLOS, Neila Márcia Silva; SOUZA, Jacqueline; LANA, Marta. **Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method.** Antimicrob Agents Chemother, v. 56, n. 6, p. 3344-8, Jun 2012.

NOIREAU, François; DIOSQUE, Patricio; JANSEN, Ana Maria. ***Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts.** Vet Res, v. 40, n. 2, p. 26, Mar-Apr 2009.

OKUMURA, M.; CORREA NETO, A. **[Experimental production of "megs" in animals inoculated with *Trypanosoma cruzi*].** Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, v. 16, p. 338-41, Sep-Oct 1961.

OLIVEIRA-SILVA, Jaquelline Carla Valamiel; MACHADO-DE-ASSIS, Girley Francisco; OLIVEIRA, Maykon Tavares; PAIVA, Nívia Carolina Nogueira; ARAÚJO, Márcio Sobreira Silva; CARNEIRO, Cláudia Martins; MARTINS-FILHO, Olindo Assis; MARTINS, Helen Rodrigues, LANA, Marta. **Experimental benznidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* II strains isolated from children of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, with Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 110, n. 1, p. 86-94, Feb 2015.

PELLEGRINO, J. **O eletrocardiograma na fase crônica da doença de Chagas experimental no cão.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 4 1946.

PRATA, Aluizio. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** Lancet Infect Dis, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

RASSI, Anis; AMATO-NETO, Vicente; RASSI, Gustavo Gabriel; FERRIOLI-FILHO, Francisco; AMATO, Valdir Sabbaga. [**Specific treatment attempt, with ticlopidine, of patients with Chagas disease chronic phase**]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 33, n. 2, p. 225-6, Mar-Apr 2000.

RASSI, A.; LUQUETTI, A. O. "**Specific treatment for *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas disease)**." American trypanosomiasis. Springer US, 2003. 117-125.

RASSI-JR, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. **Chagas disease**. Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010.

RODRIGUES COURA, José; DE CASTRO, Solange L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002.

ROQUE, André Luiz; XAVIER, Samanta C. C.; ROCHA, Marconny G.; DUARTE, Ana Cláudia M.; D'ANDREA, Paulo S.; JANSEN, Ana M. *et al.* ***Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks**. Am J Trop Med Hyg, v. 79, n. 5, p. 742-9, Nov 2008.

SANTOS, Lilian Silva; TORRES, Rosália Morais; MACHADO-DE-ASSIS, Girley Francisco; BAHIA, Maria Terezinha; MARTINS, Helen Rodrigues; TEIXEIRA-CARVALHO, Andréa; COELHO-DOS-REIS, Jordana Graziela Alves; ALBAJAR-VINÑAS, Pedro; MARTINS-FILHO, Olindo Assis; LANA, Marta. **In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n.1, p. 35-44, 2012.

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

SCHOFIELD, Chris J.; JANNIN, Jean; SALVATELLA, Roberto. **The future of Chagas disease control**. Trends Parasitol, v. 22, n. 12, p. 583-8, Dec 2006.

SEGURA, M. A.; MOLINA DE RASPI, E.; BASOMBRI, M. A. **Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanocidal treatment**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 89, n. 2, p. 213-6, Apr-Jun 1994.

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, v. 140, n. 8, p. 929-51, Jul 2013.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E. L. [**Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina**]. Medicina (B Aires), v. 59 Suppl 2, p. 166-70, 1999.

STRAUSS, Mariana; LO PRESTI, M. Silvinha; BAZÁN, Paula Carolina; BAEZ, Alejandra; FAURO, Romina; ESTEVES, Blanca; NEGRETE, Olga Sanchez; CREMONEZZI, David; PAGLINI-OLIVA, Patricia A.; RIVAROLA, H. Walter. *et al.* **Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Parasitol Int, v. 62, n. 3, p. 293-9, Jun 2013.

STREIGER, Mirtha L.; DEL BARCO, Mónica L.; FABBRO, Diana L.; ARIAS, Enrique D.; AMICONE, Norberto A. [**Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina**]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 37, n. 5, p. 365-75, Sep-Oct 2004.

TAFURI, Washington Luís; LANA, Marta; CHIARI, Egler; CALIARI, M. V.; BAMBIRRA, E. A.; RIOS-LEITE, V. H.; BARBOSA, A. J. *et al.* [**Dogs as experimental models for the study of the natural course of Chagas disease**]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 21, n. 2, p. 77, 1988 Apr-Jun 1988.

TARLETON, R.; ZHANG, L. **Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?** Parasitology today, v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TATEISHI, Tomonori; MIURA, Masatomo; SUZUKI, Toshio; UNO, Tsukasa. **The different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers.** British journal of clinical pharmacology, v. 65, n. 5, p. 693-700, 2008.

TIBAYRENC, Michel. **Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution.** Kinetoplastid Biol Dis, v. 2, n. 1, p. 12, Oct 28 2003.

TOLEDO, Max Jean de Ornelas; BAHIA, Maria Terezinha; CARNEIRO, Cláudia, M.; MARTINS-FILHO, Olindo Assis; TIBAYRENC, Michel; BARNABÉ, Christian; TAFURI, Whashington Luis; LANA, Marta. **Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes.** Antimicrob Agents Chemother, v. 47, n. 1, p. 223-30, Jan 2003.

URBINA, Julio A. **Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments.** Curr Opin Infect Dis, v. 14, n. 6, p. 733-41, Dec 2001.

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

URBINA, Julio A.; DOCAMPO, Roberto. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances.** Trends Parasitol, v. 19, n. 11, p. 495-501, Nov 2003.

VITOR RW, CHIARI Egler. **Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction I different antigenic extract.** Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 29: 178 – 182, 1987.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. **Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice.** Bull World Health Organ, v. 53, n. 1, p. 55-65, 1976.

WHO, World Health Organization. **Report of the scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas' disease.** Geneva 1984.

WHO, World Health Organization. **Control of Chagas disease.** Geneva, Switzerland 2002.

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

YAO, Ming; SRINIVAS, Nuggehally R. **Bioanalytical methods for the determination of itraconazole and hydroxyitraconazole: overview from clinical pharmacology, pharmacokinetic, pharmacodynamic and metabolism perspectives.** Biomedical Chromatography, v. 23, n. 7, p. 677-691, 2009.

VIOTTI, Rodolfo; VIGLIANO, Carlos; ÁLVAREZ, María Gabriela; LOCOCO, Bruno; PETTI, Marcos; BERTOCCHI, Graciela; ARMENTI, Alejandro; RISSIO, Ana María; COLLEY, Gretchen; TARLENTON, Rick; LAUCELLA, Susana. **Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease.** PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 9, p. e1314, 2011.

VITOR R. W.; CHIARI Egler. **Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. I different antigenic extract.** Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 29, p. 178 – 182, 1987.

ZELEDÓN, Rodrigo; DIAS, João Carlos P.; BRILLA-SALAZAR, A.; REZENDE, Marcondes; VARGAS, Luis G.; URBINA, Andrea. **Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist?** Rev Soc Bras Med Trop, v. 21, n. 1, p. 15-20, Jan-Mar 1988.

ZINGALES, Bianca; ANDRADE, Sonia G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, David A.; CHIARI, Egler; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, Eliane; MACEDO, Andrea M.; MACHADO, Carlos R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, Nancy R.; TIBAYRENC, Michel; SCHIJMAN, Alejandro G. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009.

ZINGALES, Bianca; MILES, Michael A.; CAMPBELL, David A.; TIBAYRENC, Michel; MACEDO, Andrea M.; TEIXEIRA, M. G.; SCHIJMAN, Alejandro G.; LLEWELLYN, Martins S.; LAGES-SILVA, Eliane; MACHADO, Carlos R.; ANDRADE, Sonia G.; STURM, Nancy R. *et al.* **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.** Infection, Genetics and Evolution, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.