



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

FIOCRUZ

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO
BENZONIDAZOL A OUTROS FÁRMACOS COM AÇÃO ANTI-*T. cruzi*
NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

MARCIO CERQUEIRA DE ALMEIDA

SALVADOR, BA – BRASIL

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Almeida, Marcio Cerqueira de

A447a Avaliação da associação do quimioterápico benzonidazol a outros fármacos com ação anti-*t cruzi* no tratamento da doença de chagas experimental . [manuscrito] / Marcio Cerqueira de Almeida. - 2013.

73 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

1.1.1 Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.

Orientador: Profª Drª. Sonia Gumes Andrade. Laboratório de Chagas Experimental.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma Cruzi. 3. Quimioterapia. 4. Benzonidazol. 5. Nifurtimox. 6. Cetoconazol. I.Título.

CDU 616.937:615.28

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO
BENZONIDAZOL A OUTROS FÁRMACOS COM AÇÃO ANTI-*T. cruzi*
NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL**

MARCIO CERQUEIRA DE ALMEIDA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Gumes Andrade

Co-Orientador: Prof^o. Dr^o. Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

SALVADOR, BA – BRASIL

2013

"AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO BENZONIDAZOL A OUTROS FÁRMACOS
COM AÇÃO ANTI-*T. cruzi* NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL"

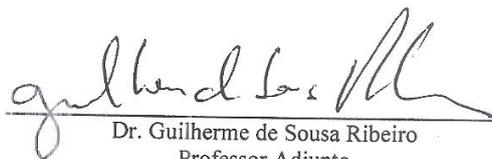
MARCIO CERQUEIRA DE ALMEIDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Daniel Abensur Atifanázio
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ

FONTE DE FINANCIAMENTO

FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/CPqGM

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os portadores da doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, Fernando e Josenice, pelo Amor, Ensinaamentos e Incentivo aos meus estudos.

À minha querida irmã Fernanda, sempre presente ao longo desta caminhada.

Aos meus irmãos, Eduardo, Fernando e Marcelo que apesar da distância sempre torceram por mim.

Aos meus avôs, Alexandrino, Eunice, Olindina (*In Memoriam*) e Terezinha, pelo Amor, Incentivo e Lições de Vida.

Aos meus tios (as) e primos (as) pelo carinho e apoio aos meus estudos.

Aos meus velhos e novos grandes amigos, sempre presentes em minha vida.

À Dr.^a Sonia Gumes Andrade, exemplo maior de Amor a profissão, de pesquisadora dedicando a maior parte da sua vida ao estudo da medicina, especialmente da doença de Chagas. Admiro seu exemplo de Humanidade e Ética. Agradeço pelas inúmeras oportunidades, pelo incentivo a minha Iniciação Científica, pelo carinho, paciência e lições de vida, que estão sendo de fundamental importância para o meu

crescimento profissional e pessoal. Agradeço pela grande oportunidade e confiança ao me indicar para a realização desse importante trabalho.

A Dr.^o Marcos André Vannier dos Santos, agradeço pelas inúmeras oportunidades desde a minha Iniciação Científica, na qual meus estudos sobre a quimioterapia da doença de Chagas foi iniciado. Agradeço pelo grande incentivo aos meus estudos, pela confiança ao me indicar para desenvolver projetos e participar de eventos importantes para o desenvolvimento desse trabalho. Admiro como pesquisador que tem projetos Educacionais como uma de suas principais linhas de pesquisa.

Ao professor Juracy Barbosa Magalhães (*In Memoriam*), pelo exemplo de profissional. Agradeço pelos ensinamentos no que se refere à teoria e prática laboratoriais, assim como pelos conselhos diários que foram fundamentais para o meu amadurecimento. Ao amigo Juracy, para mim simplesmente Professor, agradeço pela amizade que me proporcionou muitas alegrias e agora muita saudade.

A toda equipe do LACEI (Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/CPqGM/Fiocruz/Bahia) pelo apoio e amizade: Amanda, Ariane, Beatriz, Daniel, Dinalva, Fátima, Gilmar, Gabriel, Gustavo, Isa, Ísis, Jonathan, Jorge, Lorena, Marcos, Miralva, Mônica, Presciano, Renata, Rosália e Sarah.

A toda equipe do LAPEX (Laboratório de Patologia Experimental do CPqGM) pela amizade, especialmente: Dr. Zilton Andrade, Ana, Antonio, Elisângela, Everton, Flávia, Manuela, Márcia, Marcelo, Samaly e Yannick.

A toda equipe do LBP (Laboratório de Biomorfologia Parasitária do CPqGM) por terem me recebido com generosidade e muito carinho, especialmente: Ana Lúcia, Diego, Eliete, Gustavo, Karla, Mara, Rafael Gomes, Rafael Costa e Vanessa.

A Adriana, Claudio e Lúcia, da Unidade de Microscopia Eletrônica do CPqGM, pela atenção e pelo treinamento no processamento de amostras para a análise no microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Laboratório de Histotecnologia do CPqGM, pelo processamento das amostras utilizadas no presente trabalho.

A coordenação e aos funcionários da Biblioteca Eurydice Pires de Sant'Anna do CPqGM.

A toda a coordenação e funcionários do Biotério do CPqGM, pelo fornecimento e manutenção dos animais.

Ao Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC), da Fundação Oswaldo Cruz, especialmente a todos os integrantes da Rede de Quimioterapia.

Ao Dr. Álvaro Romanha e Policarpo Júnior, do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz/Minas Gerais, pela colaboração em projetos de Associação de medicamentos vinculados ao PIDC.

A todos aqueles que fazem os serviços de limpeza do CPqGM, especialmente Lia e Claudio.

A coordenação e aos professores do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do CPqGM.

A diretoria e a todos os funcionários do CPqGM, por fazerem deste Centro de Pesquisa uma referência mundial.

A Fundação Oswaldo Cruz pelo incentivo e manutenção dos cursos de Pós-Graduação do CPqGM.

“As três palavras mais importantes do dicionário são: querer, trabalhar e esperar. São essas as três pedras angulares sobre as quais hei de construir a pirâmide de meu êxito.” (Louis Pasteur, 1822-1895)

ALMEIDA, Marcio Cerqueira. Avaliação da associação do quimioterápico benzonidazol a outros fármacos com ação anti-*T. cruzi* no tratamento da doença de Chagas experimental. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil, 2013.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que ainda existam 10 milhões de pessoas infectadas na América Latina. Para a quimioterapia específica da DC o benzonidazol (BZ) é o medicamento de escolha. A eficácia terapêutica dos compostos atualmente em uso clínico tem sido questionada, tendo em conta os diferentes índices de cura já registrados na literatura. A associação do BZ, com medicamentos que apresentem um efeito anti-*T. cruzi* poderá potencializar a ação antiparasitária do mesmo e possivelmente permitirá o uso de doses menores e consequentemente diminuição dos efeitos tóxicos. O objetivo da presente investigação é avaliar o efeito do tratamento com o BZ associado aos medicamentos nifurtimox (NF) e cetoconazol (CETO), em duplas combinações, sobre o curso da infecção aguda pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos suíços. Foram feitos três experimentos: A e B, nos quais os camundongos foram inoculados com 5×10^4 formas de tripomastigotas sanguícolas do *T. cruzi* e o C formado por animais não infectados. O tratamento foi feito por entubação (via oral) a partir do 6º dia pós-infecção e teve duração de 60 dias. *Experimento A* (A1 – controles infectados e não tratados; A2 – infectados e tratados com 100 mg/kg/dia BZ; A3 – infectados e tratados com dose inicial de 200mg/kg/dia e seguidos de 50 mg/kg/dia NF; A4 – infectados e tratados com BZ + NF); *Experimento B* (B1 – controles infectados e não tratados; B2 – infectados e tratados com 100 mg/kg/dia BZ; B3 – infectados e tratados com 120 mg/kg/dia CETO; B4 – infectados e tratados com BZ + CETO); *Experimento C* (C1 – tratados com 100 mg/kg/dia BZ; C2 – tratados com dose inicial de 200 mg/kg/dia seguido de 50 mg/kg/dia NF; C3 – tratados com 120 mg/kg/dia CETO; C4 – tratados com BZ + NF; C5 – tratados com BZ + CETO). Os níveis parasitêmicos e a mortalidade foram avaliados a partir do 6º dia pós-infecção, e trinta dias após o fim do tratamento foram realizados os testes de cura parasitológicos (parasitemia, xenodiagnóstico e hemocultura) e o teste sorológico de imunofluorescência indireta (IFI). O critério de cura foi baseado na combinação dos resultados dos testes de cura parasitológicos com a IFI. Os resultados do *Experimento A* indicaram uma taxa de mortalidade de 100% para o grupo controle, 5,26% para os grupos BZ e BZ + NF e 0% para o NF; o índice de cura foi de 80% para o grupo BZ, 5,26% para o NF e 100% para o BZ + NF; Os resultados do *Experimento B* mostraram uma taxa de mortalidade de 100% para o grupo controle, 0% para os grupos BZ e CETO, e 5,26% para o BZ + CETO; o índice de cura foi de 80% para o grupo BZ, 81,8% para o CETO e 100% para o BZ + CETO. O estudo histopatológico demonstrou que o tratamento com BZ isoladamente ou em combinação com o NF ou com o CETO determinou significativa diminuição da intensidade das lesões no miocárdio e músculo esquelético quando comparado aos controles não tratados. O grupo GC, não demonstrou alterações inflamatórias em miocárdio. Em conclusão, o tratamento combinado do BZ com outras drogas (NF e CETO) não determinou aumento significativo dos índices de cura e diminuição das lesões histopatológicas do miocárdio quando comparado com o tratamento isolado com o BZ. Provavelmente, o uso neste trabalho, de doses previamente estabelecidas, influenciou no efeito das referidas associações. Novos experimentos são necessários, com o uso de doses decrescentes do BZ, para melhor avaliar o efeito das referidas combinações sobre a toxicidade da droga.

Palavras - chave: doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; quimioterapia; benzonidazol; nifurtimox; cetoconazol.

ALMEIDA, Marcio Cerqueira. Evaluation of the use of the association of the chemotherapy with Benznidazole with other drugs with an anti-*T. cruzi* action in the treatment of experimental Chagas disease. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil, 2013.

ABSTRACT

Chagas' disease (CD) is caused by the hemoflagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. It is estimated that 10 million infected people are still living in Latin America. For the specific chemotherapy of CD, the Benznidazole (BZ) is the drug of choice. However, the therapeutic efficacy of the compounds now in clinical use is not confirmed, taking into account that different cure rates have been registered. It is possible that the association of BZ with other drugs with an anti-*T. cruzi* action could improve its anti-parasitic effect, with the use of lower dose and consequent decrease of the toxic effects. The objective of the present investigation is to evaluate the effect of the treatment with BZ in association with the drugs Nifurtimox (NF) and Ketoconazole (CETO) in double combinations, on the evolution of the acute phase of the infection of Swiss mice, with the Y strain of *T. cruzi*. Three experimental groups were performed: Group A (GA) and Group B (GB) in which the mice were inoculated with 5×10^4 trypomastigote blood forms; Group GC of uninfected mice, submitted to the same treatment schedules. Treatment was performed by gavage (oral route) from the 6th day after infection, during 60 days; Group GA: I - infected, non treated controls; II - infected and treated with 100 mg/kg/day of BZ; III - infected and treated with NF (initially 200 mg/kg/day, followed by 50 mg/kg/day); IV - infected and treated with BZ + NF; Group GB: I - infected, non treated controls; II - infected and treated with 100 mg/kg/day of BZ; III - infected and treated with 120 mg/kg/day CETO; IV - infected and treated with BZ + CETO; Group C: I - treated with 100 mg/kg/day of BZ; II - treated with NF (initially 200 mg/kg/day, followed by 50 mg/kg/day); III - treated with 120 mg/kg/day CETO; IV - treated with BZ + NF; V - treated with BZ + CETO. Parasitemia and mortality were evaluated from the 6th day of infection. Thirty days after the end of treatment, parasitologic cure tests of the mice of the several groups were performed (parasitemia after Cyclophosphamide injection: 250mg/kg b.w, xenodiagnosis and hemoculture). Cure criteria was based on the combination of the results of parasitological tests and the serological titles (cut off 1:20). Results: GA - 100% of mortality for untreated control, 5,26% for sub-groups BZ and BZ +NF and 0% for NF group. Cure rate was of 80% for the subgroup BZ, 5.26%, for the NF group and 100% for the group BZ+NF Results - GB - 100% of mortality for untreated controls; 0% for the subgroups BZ and CETO and 5.26% for the group BZ + CETO. Cure rates: 80% for the subgroup BZ, 81.8% for the subgroup CETO and 100% for the group BZ + CETO. Histopathological study showed that treatment with BZ only or in combination with NF or CETO determined significant decrease in the intensity of the inflammatory lesions of the myocardium and skeletal muscles, as compared with untreated controls. However isolated treatment with NF or CETO did not determined regression of the inflammatory lesions. The group GC did not show inflammatory lesions in the myocardium or skeletal muscle. *Conclusion* - the combined treatment with BENZ and other drugs (NF and CETO) did not determine a significant increase of the cure indices when compared to the isolated treatment with BZ. These combinations have not determined a significant decrease of histopathological lesions of the myocardium, as compared to the treatment with BZ. Probably the use of previously established doses interferes with the analysis of the effect of the cited combinations. New experiments are necessary with the use of lower doses of BZ to a better evaluation of the efficacy and toxicity of the drug.

Keys word: chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; chemotherapy; benznidazole; nifurtimox; ketoconazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estrutura Química do nifurtimox (5 – nitrofurano) e do benzonidazol (2 – nitroimidazol).	26
FIGURA 2	Níveis parasitêmicos do experimento A.	42
FIGURA 3	Mortalidade cumulativa (%) do experimento A.	42
FIGURA 4	Secções de coração de camundongos do experimento A: controles infectados e não tratados e tratados com BZ.	49
FIGURA 5	Secções de coração de camundongos do experimento A: tratados com NF e tratados com BZ + NF.	50
FIGURA 6	Níveis parasitêmicos do experimento B.	52
FIGURA 7	Mortalidade cumulativa (%) do experimento B.	52
FIGURA 8	Secções de coração e músculo esquelético de camundongos do experimento B: tratados com BZ, CETO e BZ + CETO.	58
FIGURA 9	Secções de coração de camundongos do experimento C: tratados com BZ, NF, CETO, BZ + NF e BZ + CETO.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos do experimento A: tratados com BZ.	44
Tabela 2	Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos do experimento A: tratados com NF.	45
Tabela 3	Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos do experimento A: tratados com BZ + NF.	46
Tabela 4	Índice de cura do experimento A: tratados com BZ, NF e BZ + NF.	47
Tabela 5	Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos do experimento B: tratados com BZ.	53
Tabela 6	Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos do experimento B: tratados com CETO.	54
Tabela 7	Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos do experimento B: tratados com BZ + CETO.	55
Tabela 8	Índice de cura do experimento B: tratados com BZ, CETO e BZ + CETO.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BZ	Benzonidazol
CETO	Cetoconazol
CEUA	Comitê de Ética e pesquisa no uso de animais
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DNA	Ácido desoxirribonucléico
IFI	Imunofluorescência Indireta
igG	Imunoglobulina
kDNA	DNA do cinetoplasto
kg	Quilograma
LACEI	Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular
LBP	Laboratório de Biomorfologia Parasitária
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
NEG	Negativo
NF	Nifurtimox
NR	Não realizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPS	Organização Pan Americana de Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada
pH	Potencial Hidrogeniônico
POS	Positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	20
2.1 A Trypanosomíase americana: a doença de Chagas.....	20
2.2 O agente etiológico: <i>Trypanossoma cruzi</i>	20
2.3 O vetor e as formas de transmissão.....	22
2.4 O quadro clínico.....	23
2.5 A quimioterapia.....	25
2.5.1 A associação de fármacos para o tratamento da doença de Chagas.....	28
3. JUSTIFICATIVA	30
4. HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo geral.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
7. MATERIAIS E MÉTODOS	33
7.1 Animal experimental.....	33
7.2 Cepa do <i>T. cruzi</i>	33
7.3 Cálculo do inoculo.....	33
7.4 Fármacos.....	34
7.5 Grupos experimentais.....	34

7.5.1 Grupos infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> (Experimentos A e B).....	34
7.5.2 Grupo não infectado (Experimento C).....	35
8. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	35
8.1 Esquema terapêutico.....	35
8.2 Parasitemia.....	36
8.3 Mortalidade.....	36
8.4 Critério e Testes de Cura Parasitológicos e Sorológico.....	37
8.4.1 Critério de Cura.....	37
8.4.2 Testes de cura parasitológicos.....	37
8.4.2.1 Parasitemia.....	37
8.4.2.2 Xenodiagnóstico.....	37
8.4.2.3 Hemocultura.....	38
8.4.3 Teste Sorológico: Reação de Imunofluorescência Indireta.....	38
8.5 Estudo Histopatológico.....	39
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
10. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
11. RESULTADOS.....	41
12. DISCUSSÃO.....	61
13. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da doença de Chagas em 1909, os avanços da medicina vêm permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos que regem essa enfermidade, o que é imprescindível para proporcionar novas opções terapêuticas e, assim, uma maior sobrevida aos portadores da doença de Chagas. Entretanto, a doença ainda é considerada como um sério problema de saúde pública. As opções de tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* são limitadas, fazendo com que milhões de pacientes ainda necessitem de um tratamento mais eficaz, menos tóxico, de facilidade de administração em período curto e que pode promover a cura.

O tratamento desta parasitose ainda depende de dois medicamentos desenvolvidos na década de 70: o nifurtimox (BOCK *et al.*, 1972) e o benzonidazol (RICHLE, 1973). Contudo, ambos os compostos apresentam limitações quanto à eficácia e a tolerabilidade (RASSI *et al.*, 2012). A administração de um grande número de doses por um período longo pode causar sérios efeitos colaterais aos pacientes, como anorexia, depressão do sistema nervoso central, polineuropatia periférica e dermatite, que levam à interrupção do tratamento pelo médico (CANÇADO, 2000). Além disso, diferentes cepas do *T. cruzi* têm demonstrado nítidas diferenças de suscetibilidade aos quimioterápicos benzonidazol e nifurtimox (ANDRADE e FIGUEIRA, 1977). As variações quanto ao grau de resistência foram relacionadas com os diferentes biotopos (ANDRADE, 1985a). Estes estudos caracterizaram as cepas de Tipo I (Y e Peruana) como de alta suscetibilidade, as de Tipo II (cepas de São Felipe e Mambá) como de média suscetibilidade e as de Tipo III (Colombiana e Montalvânia) como de alta resistência.

Dessa forma, em decorrência da sua alta prevalência e elevadas taxas de morbi-mortalidade, a busca por fármacos que possam combater eficazmente o *T. cruzi* na fase aguda, assim como na fase crônica da doença, levando à cura caracterizada por resultados parasitológicos e sorológicos negativos vêm sendo o objetivo de diversas pesquisas (BRENER, 1962; ANDRADE *et al.*, 1987; URBINA *et al.*, 2007; ROMANHA *et al.*, 2008; APT, 2010). Ainda assim, tanto do ponto de vista clínico como experimental, o desenvolvimento de um tratamento específico continua sendo um desafio.

Atualmente, as linhas de pesquisas relacionadas à quimioterapia na doença de Chagas estão direcionadas à busca de princípios ativos de plantas (CASTRO, 1993), utilização de drogas com atividade anti-*T. cruzi*, mas que são usadas para diferentes nosologias (APT, 2011) e também à busca pela identificação de alvos metabólicos específicos do parasito (BACCHI *et al.*, 1995; MENEZES *et al.*, 2006). A tendência atual é que sejam utilizadas combinações de drogas, como sugerido por COURA (2009).

A combinação de fármacos já disponíveis no arsenal terapêutico atual é uma alternativa para o desenvolvimento racional de novas condutas terapêuticas. No tratamento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), por exemplo, a terapia combinada (Terapia Antiretroviral) vem reduzindo consideravelmente a mortalidade e a morbidade, aumentando dessa forma a qualidade de vida dos pacientes com AIDS (OMS, 2005). Outro destaque da associação de drogas é o tratamento atual da tuberculose que utiliza uma combinação de quatro fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) prevenindo a resistência adquirida, ao evitar a monoterapia (De SOUZA *et al.*, 2007).

No presente trabalho investigou-se a eficácia da combinação binária de drogas, cuja ação isolada *in vivo* contra o *T. cruzi* tem sido demonstrada, fazendo-se diferentes associações e testando a ação destas combinações na infecção experimental com a cepa Y do *T. cruzi*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Trypanossomíase americana: a doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, vem despertando interesse cada vez maior da classe médica devido a sua alta prevalência e suas elevadas taxas de morbi-mortalidade, especialmente em populações camponesas e marginais das áreas endêmicas (DIAS, 1990).

Estima-se que existam 10 milhões de seres humanos infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob o risco de infecção, em 18 países endêmicos (WHO, 2010). Segundo Dias (2007), esta já causou perdas sociais importantes nas áreas endêmicas, em termos de mortalidade, incapacidade laboral e custos médico-sociais, números esses geralmente ignorados por políticos e governos, principalmente devido à evolução crônica e pouca visibilidade da doença.

A descoberta de Carlos Chagas é considerada um grande marco na história da medicina tropical do Brasil. O seu maior mérito foi descrever a doença por completo em todos os seus principais parâmetros: o agente etiológico, as formas de transmissão, a epidemiologia, as medidas profiláticas, os aspectos clínicos e os princípios da base terapêutica.

2.2 O agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae, a qual se compõem de organismos flagelados, com um cinetoplasto que contém 25% do DNA total da célula, designado kDNA, o qual juntamente com o DNA nuclear, é muito importante para a determinação dos caracteres genômicos do parasito (DVORAK, 1982). O *T. cruzi* apresenta considerável variabilidade morfológica, fisiológica e ecológica, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade (ANDRADE, 1974).

Quando os parasitos são isolados do ser humano, de animais ou do hospedeiro invertebrado, e mantidos no laboratório em culturas axênicas ou por passagens sucessivas em animais suscetíveis, as amostras obtidas são designadas

“cepas” do *T. cruzi* (ANDRADE e ANDRADE, 1998). Estas podem representar populações diferentes quanto ao seu comportamento biológico (ANDRADE, 1974; ANDRADE e MAGALHÃES, 1997), quanto ao seu perfil isoenzimático (ROMANHA, 1982; MILES *et al.*, 1986) e quanto aos seus caracteres moleculares, pela caracterização do DNA do cinetoplasto (MOREL *et al.*, 1980).

A descrição das cepas do *T. cruzi*, em tipos (I, II, III) ou biodemas, permitiu correlacionar os caracteres próprios do parasito com a resposta do hospedeiro vertebrado (modelo animal, principalmente camundongos), através da avaliação da patogenicidade, do tropismo tissular, das lesões histopatológicas, da resposta imunológica e quimioterápica (ANDRADE, 1974; ANDRADE e MAGALHÃES, 1997). Estes estudos mostraram que na infecção com o biodema tipo I (cepa Y), há acentuado macrofagotropismo na fase inicial da infecção, alta virulência com 100% de mortalidade até 12 dias, pico parasitemico do 7º ao 12º dia e suscetibilidade à quimioterapia com o benzonidazol e o nifurtimox. Durante a infecção pelo biodema tipo II (cepa 21 SF), cuja parasitemia tem um curso mais lento entre o 12º e o 20º dias, há intenso parasitismo do miocárdio na fase aguda, com intenso processo de miocardite e moderada resistência aos quimioterápicos. As cepas do biodema tipo III (cepa Colombiana) determinam intensas lesões miocárdicas e de músculo esquelético, com acentuada proliferação intracitoplasmática de parasitos e alta resistência aos quimioterápicos.

A padronização das cepas do *T. cruzi* de acordo com diversos parâmetros (biológicos, bioquímicos e moleculares), contribuiu, significativamente, para a compreensão da importância do parasito no determinismo dos quadros mórbidos da doença de Chagas experimental (ANDRADE, 1974). Em 2009, um novo Consenso, estabeleceu uma subdivisão do *T. cruzi* em grupos descritos por Tibayrenc (1998), como Distintas Unidades Típicas (DTUs) baseada nos caracteres genéticos de três genes polimórficos, estabelecendo os genótipos do *T. cruzi* I – VI. (ZINGALES *et al.*, 2009).

Aplicando a nova nomenclatura, Andrade e colaboradores (2011) fizeram um estudo comparativo da caracterização de cepas do *T. cruzi* baseada em biodemas e zimodemas com a atual nomenclatura com confirmação dos resultados previamente obtidos.

2.3 O Vetor e as formas de transmissão

Os insetos vetores, conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”, são hemípteros hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae. É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos Estados Unidos à Argentina. São mais de cem espécies responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi*, intervindo na manutenção da enzootia chagásica (DIAS e VINHAES, 2000). Algumas merecem maior atenção da Saúde Pública, como por exemplo: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* (WHO, 2002).

Das formas de transmissão da doença de Chagas, é a transmissão natural via vetor o mecanismo primário, do qual dependeu o estabelecimento de outras formas de veiculação da doença. Esta parasitose se origina de um ciclo primitivo do *T. cruzi*, de natureza eminentemente enzoótica, circulando o flagelado entre os vetores e reservatórios silvestres ao longo da maior parte do continente americano, provavelmente há milhares de anos (DIAS e MACEDO, 2005).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nos dejetos do vetor, são inoculadas através da pele ou mucosas do hospedeiro. Ao penetrar no organismo, o parasito é fagocitado por macrófagos, escapa do vacúolo fagocítico para o citosol onde se diferencia para a forma amastigota e se multiplica ativamente por divisão binária. Após o rompimento da membrana da célula hospedeira, os tripomastigotas sanguícolas são liberados e podem infectar células adjacentes ou ganhar a corrente sanguínea e atingir outras células hospedeiras, ou serem ingeridos pelo triatomíneo e dar assim, continuidade ao ciclo de multiplicação no inseto vetor (DE SOUZA, 2000). Dessa forma, o *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo, do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e outra extracelular, no vetor.

Além da transmissão vetorial que ainda responde por cerca de 80% dos casos de infecção, o parasito pode ser transmitido ao homem por vias alternativas como a transfusional, congênita, transplante de órgãos e através de acidentes laboratoriais (DIAS, 2000). A transmissão oral através de alimentos contaminados foi também registrada em diferentes estados brasileiros e estudada em animais experimentais por diversos pesquisadores (NERY GUIMARÃES *et al.*, 1968;

SHIKANAY-YASUDA *et al.*, 1991; CAMANDAROBA *et al.*, 2002; STEINDEL *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2011).

A estratégia corrente contra a doença de Chagas envolve, basicamente, a luta antivetorial (inseticidas e melhoria habitacional) e a prevenção da transmissão transfusional. Esta estratégia é efetiva e tem produzido resultados positivos em praticamente todos os lugares onde vem sendo aplicada com um mínimo de rigor técnico e com necessária continuidade (WHO, 1991; SCHMUÑIS, 2000).

Em junho de 2006, o Brasil recebeu uma certificação relativa à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor (*Triatoma infestans*) e pela via transfusional, concedida pela OPS/OMS (DIAS, 2006). Entretanto, outras espécies continuam sendo encontradas em nosso território (MASSARO *et al.*, 2008).

2.4 O quadro clínico

No hospedeiro vertebrado, a infecção pelo *T. cruzi* é responsável pelas alterações celulares, tissulares, patológicas e imunológicas, ou seja, o papel do parasito é fundamental na origem e curso das lesões. Deste modo, estas respostas específicas do organismo, determinam um complexo clínico-patológico designado como doença de Chagas a qual apresenta três fases clínicas: aguda, indeterminada e crônica (RASSI *et al.*, 2012).

O quadro clínico da fase aguda é definido pela presença de tripomastigotas no sangue periférico, comprovada pela demonstração através de métodos diretos de exame. Ela pode ser inaparente (assintomática ou oligossintomática) e aparente, caracterizada pelas manifestações comuns a qualquer infecção sistêmica, como febre, taquicardia, discreta esplenomegalia e adenomegalia (DIAS e COURA, 1997; ANDRADE, 2000). A porta de entrada da infecção pode ser aparente, como o sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral com adenite satélite pré-auricular) e o Chagoma de inoculação (presente na pele, que geralmente dura 15 dias ou mais). As manifestações de comprometimento cardíaco são as de uma miocardite aguda difusa (RASSI *et al.*, 2012). Esta é causada pela multiplicação parasitária acompanhada por reações de hipersensibilidade humoral e celular, com destruição de fibras miocárdicas parasitadas e algumas não parasitadas. As manifestações clínicas podem variar desde discreta taquicardia, com pequeno aumento da área

cardíaca, até os sinais de insuficiência cardíaca congestiva (ANDRADE e ANDRADE, 1998).

A causa principal de morbidade e mortalidade é o acometimento cardíaco, que ocorre de 5 a 30 anos após a infecção primária em 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (CUNHA-NETO *et al.*, 2006).

Na fase indeterminada destacam-se os indivíduos assintomáticos com evidências parasitológicas e/ou sorológicas de infecção pelo parasito, apresentando exame clínico normal e ausência de alterações no eletrocardiograma (ECG) e nos exames radiográficos (área cardíaca, esôfago e cólon normais). De modo geral, os pacientes apresentam um bom estado de saúde. De acordo com Ribeiro e Rocha (2000), mais de 50% dos indivíduos diagnosticados com infecção pelo *T. cruzi* apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas.

Por outro lado, segundo Andrade e Andrade (1998), a cardiopatia chagásica crônica é caracterizada por uma miocardiopatia inflamatória, evolutiva, fibrosante, que destrói progressivamente o miocárdio e compromete o sistema de formação e de condução do estímulo cardíaco. Macroscopicamente, o coração afetado pode se apresentar com peso e volume normal ou progressivamente aumentado (DIAS e MACEDO, 2005).

Na forma crônica digestiva, as lesões predominam no esôfago e no cólon terminal (megaesôfago e megacólon), principalmente nos segmentos que têm conteúdos mais sólidos, envolvendo alterações motoras, anatômicas, de absorção e de secreção (REZENDE e MOREIRA, 2000).

Os avanços no controle da doença de Chagas permitiram o encontro, cada vez mais raro, de pacientes na fase aguda. Entretanto, estima-se que exista cerca de 3,5 milhões de pacientes com doença de Chagas crônica remanescente nos países endêmicos, dos quais 20% a 30% apresentam comprometimento cardíaco (OLIVEIRA, 2005). Dessa forma, milhões de pacientes ainda necessitam de atenção médica e tratamento específico.

2.5 A quimioterapia

O tratamento etiológico da doença de Chagas tem como objetivo a erradicação do *T. cruzi* e a prevenção do aparecimento dos seus efeitos patogênicos ou do agravamento das lesões nos órgãos já existentes. Portanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza um esquema terapêutico precoce e por tempo prolongado para os casos agudos, crônicos, congênitos e de regudização em pacientes sob tratamento imunossupressor ou na imunossupressão decorrente da infecção pelo HIV (vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (OMS, 1992).

Observa-se na literatura que ao longo da história, sobre a quimioterapia da doença de Chagas, uma série de drogas foram testadas tanto em animais quanto em pacientes (COURA e CASTRO, 2002). Destaca-se primeiramente, o período de 1912 a 1962, no qual diversos compostos das mais variadas classes foram introduzidos na terapêutica. Os antimoniais, arsenicais, semicarbazonas, sulfoamidas, diamidinas, nitrofuranos, antibióticos e imidazólicos foram capazes de suprimir a parasitemia, entretanto, não promoviam a cura parasitológica e em muitos casos o efeito das drogas era apenas sobre uma das formas do parasito (BRENER, 1975). Os critérios de cura adotados no referido período eram baseados apenas na avaliação da parasitemia e da mortalidade (BRENER, 2000).

A padronização do esquema de tratamento, de longa duração, realizado por Brener (1961) representou um grande avanço no estudo da quimioterapia da doença de Chagas. Seguindo esse princípio, a eficácia de alguns compostos foi demonstrada em modelos experimentais de infecção com o *T. cruzi*. A nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeido-semicarbazona), por exemplo, na dose diária de 100 mg/kg em esquema de longa duração, curou mais de 95% dos camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* (BRENER, 1961). Entretanto, o mesmo não foi observado em 10 pacientes na fase aguda, que apresentaram bons resultados com o tratamento, mas a metade deles apresentou xenodiagnóstico positivo (CANÇADO *et al.*, 1964).

A partir de 1967 outros nitrofuranos foram introduzidos no tratamento da doença de Chagas (BOCK *et al.*, 1969). Dentre estes se destacam, o nifurtimox (5-nitrofurano) e o benzonidazol (2-nitroimidazol), que passaram a dar novas

perspectivas para o tratamento devido à eficácia na fase aguda, assim como pela tolerância (FIGURA 1).

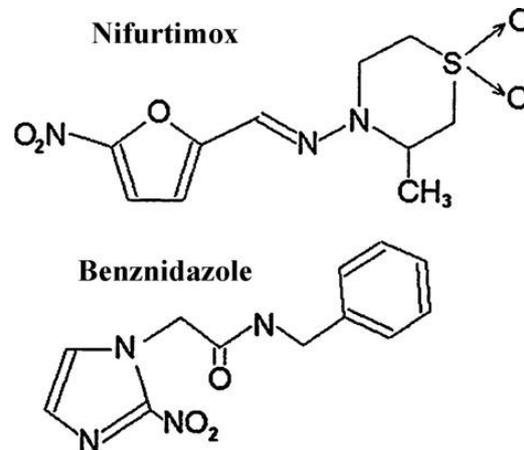


Figura 1: Estrutura química do nifurtimox (5-nitrofurano) e do benznidazol (2-nitroimidazol).

O nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahidro-4H-1,4-tiazina 1,1-dióxido) (BOCK *et al.*, 1972) e o benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) (RICHLE, 1973) se mostraram ativos *in vitro* e *in vivo* contra as formas evolutivas do *T. cruzi*. Estudos indicam que o mecanismo de ação do nifurtimox e do benznidazol está relacionado com a formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (MAYA *et al.*, 2003). O grupo nitro (NO₂) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂ (MAYA *et al.*, 2007). No caso do nifurtimox, o mecanismo de ação está relacionado à produção de radicais livres, através de um processo de auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original (ciclo redox) e formar o radical ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (DOCAMPO e STOPPANI, 1979). O efeito tripanocida está ligado diretamente a estas espécies, através de mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi* (GOIJMAN e STOPPANI, 1985). Por outro lado, indícios experimentais indicam que o benznidazol não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (DOCAMPO e MORENO, 1985). Evidências indicam que o mecanismo de ação do benznidazol está relacionado ao estresse redutivo, que poderia inibir a síntese de macromoléculas por

ligação covalente, ou por outras interações de nitroredução com os componentes celulares do parasito (POLAK e RICHLE, 1978). Além disso, é descrito também que o benzonidazol potencializa a fagocitose e a produção de citocinas que lisam o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988).

Os metabólitos (eletrofilicos) formados através do mecanismo de ação do benzonidazol e do nifurtimox apresentam baixa especificidade, o que contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes. Os efeitos mais comuns são perda de peso, sonolência, distúrbios digestivos, manifestações de hipersensibilidade (dermatite com erupção cutânea), depressão da medula óssea (neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica) e polineuropatia periférica (parestesias e polineurite) (RASSI, 2012). Além disso, os casos refratários e a presença de cepas resistentes vêm refletindo na diminuição da frequência do uso clínico desses medicamentos.

Ainda assim, o benzonidazol e o nifurtimox são os medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Chagas, sendo o benzonidazol o de primeira escolha por mostrar maior eficácia que o nifurtimox. A eficácia dessas drogas foi demonstrada clinicamente e experimentalmente, nas fases aguda e crônica, por diversos pesquisadores, embora o tratamento na fase crônica ainda seja controverso, já que diversos casos de cura parasitológica não são acompanhados de sorologia negativa. Todavia, Andrade *et al* (1991) sugerem o tratamento na fase crônica após identificarem experimentalmente, que a soro-positividade de pacientes tratados e considerados curados, estaria relacionada a presença de antígenos parasitários em células do baço, indicando a persistência de uma memória imunológica. Outros estudos ainda sugerem o tratamento na fase crônica, já que foi comprovado experimentalmente a diminuição do processo inflamatório e fibrótico, em tecido muscular cardíaco e esquelético de camundongos sob tratamento quimioterápico (ANDRADE e ANDRADE, 1976).

Embora o benzonidazol e o nifurtimox ainda sejam as drogas mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas, a busca por outros fármacos e/ou alternativas para a quimioterapia, vem sendo objeto de estudo de diversos pesquisadores. O exemplo disso está na busca de princípios ativos com potencial tripanocida, presente em extratos de plantas e produtos naturais, que revelou a existência de uma série de compostos com ação antiparasitária, como

naftoquinonas, terpenóides, isoflavonas e alcalóides (MORELLO *et al.*, 1994; HIGASHI e CASTRO, 1994; BERNARDES *et al.*, 2006). Além disso, outros estudos vêm identificando vários processos bioquímicos específicos do parasito como potenciais alvos terapêuticos, como, por exemplo: a enzima tripanotiona redutase, importante para a manutenção do balanço tiol-redox da célula (FAIRLAMB, 1994); metabolismo de poliaminas, fundamental para o sistema de defesa antioxidante do parasito (BACCHI e YARLETT, 1995; MENEZES *et al.*, 2006); DNA topoisomerase, que tem papel essencial na replicação do DNA do *T. cruzi* (GONZALES-PERDOMO, *et al.*, 1990) e outros.

Ademais, uma série de drogas utilizadas para diferentes nosologias e que apresentam atividade anti-*T. cruzi*, também se tornaram uma alternativa para o tratamento da doença de Chagas. Destacam-se, nesse caso, diversos antifúngicos inibidores da biossíntese de ergosterol. O *T. cruzi* requer esteróis específicos para a sua proliferação e a viabilidade de células em todos os estágios de seu ciclo. Nesse sentido, o cetoconazol, o itraconazol e mais recentemente o posoconazol mostraram que possuem atividade tripanossomicida *in vitro* e *in vivo* (McCABE *et al.*, 1983; MOREIRA *et al.*, 1992; URBINA *et al.*, 2007). O alopurinol, utilizado para o tratamento da gota, também mostrou atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* e em alguns casos selecionados, em pacientes crônicos (AVILA e AVILA, 1981; AGUILERA *et al.*, 1987; APT *et al.*, 1994).

Dessa forma, diante do quadro atual do tratamento da doença de Chagas, no qual apenas dois compostos são recomendados pela OMS e que não desperta interesse das grandes indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novas drogas, a associação de medicamentos já existentes e que apresentem efeito anti-*T. cruzi* é a alternativa terapêutica mais promissora para o tratamento dessa parasitose.

2.5.1 Associação de fármacos para o tratamento da doença de Chagas

De um modo geral, a combinação de fármacos já foi testada por inúmeros pesquisadores na infecção experimental pelo *T. cruzi*, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e/ou reduzir a intensidade de reações adversas (MALDONATO *et al.*, 1993). Em recente revisão Coura (2009) sugere o desenvolvimento de novas estratégias, para o tratamento da doença de Chagas, utilizando associação de

medicamentos já existentes com o objetivo de obter uma maior eficácia da quimioterapia contra o *T. cruzi*.

A existência de cepas resistentes aos fármacos atualmente em uso e a limitação dos mesmos devido à toxicidade, faz com que a quimioterapia de combinação seja mais vantajosa do que a monoterapia. Nesse sentido, os fármacos podem interagir de modo sinérgico aumentando a eficiência e diminuindo a probabilidade do desenvolvimento de resistência.

Araújo *et al* (2000), por exemplo, investigaram o efeito sinérgico da associação de alguns medicamentos em diferentes cepas do *T. cruzi*. Nesse caso, foi observado um efeito sinérgico na combinação do benzonidazol com o cetoconazol em camundongos infectados com as cepas CL e Y do *T. cruzi*. Em outro estudo, Urbina e *et al* (1993), demonstraram em modelo murino da doença de Chagas que a lovastatina potencializa os efeitos terapêuticos do cetoconazol eliminando os parasitos circulantes e aumentando a sobrevivência dos animais. Sendo assim, os autores sugerem a combinação da lovastatina com azólicos, como o cetoconazol, como uma alternativa para a quimioterapia.

Além disso, a literatura destaca também outros estudos nos quais a combinação de medicamentos potencializa o efeito anti-*T. cruzi*: estudos *in vitro* revelaram que a aspirina potencializa o efeito do nifurtimox e do benzonidazol ao aumentar a atividade antiparasitária dos macrófagos (LOPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2010); a combinação do benzonidazol com compostos heterocíclicos, como as diamidinas, foi capaz de reduzir a parasitemia em 90%, promover uma sobrevivência de 100% e reduzir as lesões tissulares em 56%, nos camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, em relação aos animais tratados somente com o benzonidazol (BATISTA *et al.*, 2011) e no tratamento do benzonidazol associado com o quelante de ferro, desferrioxamina, foi observado que alterações nos níveis de ferro em combinação com o benzonidazol promoveu uma taxa de 67% de sobrevivência nos animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (FRANCISCO *et al.*, 2008).

Para realizar o presente trabalho foram buscados os dados da literatura, para identificar medicamentos já em uso clínico para diferentes nosologias, sendo, portanto bem testadas quanto à sua toxicidade e possíveis efeitos colaterais, que tenham de algum modo sido previamente testadas quanto à sua ação parasiticida anti-*T. cruzi*. Foram escolhidos para o presente estudo de combinação de drogas, o benzonidazol, o nifurtimox e o cetoconazol.

3. JUSTIFICATIVA

A eficácia terapêutica dos compostos atualmente em uso clínico para o tratamento da doença de Chagas, tem sido questionada pelos diversos pesquisadores, tendo em conta os diferentes índices de cura que têm sido registrados pelo uso das mesmas, com alta percentagem de fracasso terapêutico. Este fato pode estar relacionado aos mecanismos de ação antiparasitária dos referidos fármacos ou à resistência de cepas do *T. cruzi*. A associação do benzonidazol, com medicamentos que apresentem um efeito anti-*T. cruzi* sobre as formas intracelulares do parasito poderá potencializar a ação antiparasitária do mesmo e possivelmente permitirá o uso de doses menores e conseqüentemente diminuição dos efeitos tóxicos.

4. HIPOTESE DE INVESTIGAÇÃO

Partindo do princípio que o benzonidazol, o nifurtimox e o cetoconazol atuam inibindo diferentes mecanismos moleculares do *T. cruzi*, a combinação binária destas drogas (benzonidazol + nifurtimox e benzonidazol + cetoconazol) poderá potencializar o efeito anti-*T. cruzi*.

5. OBJETIVOS

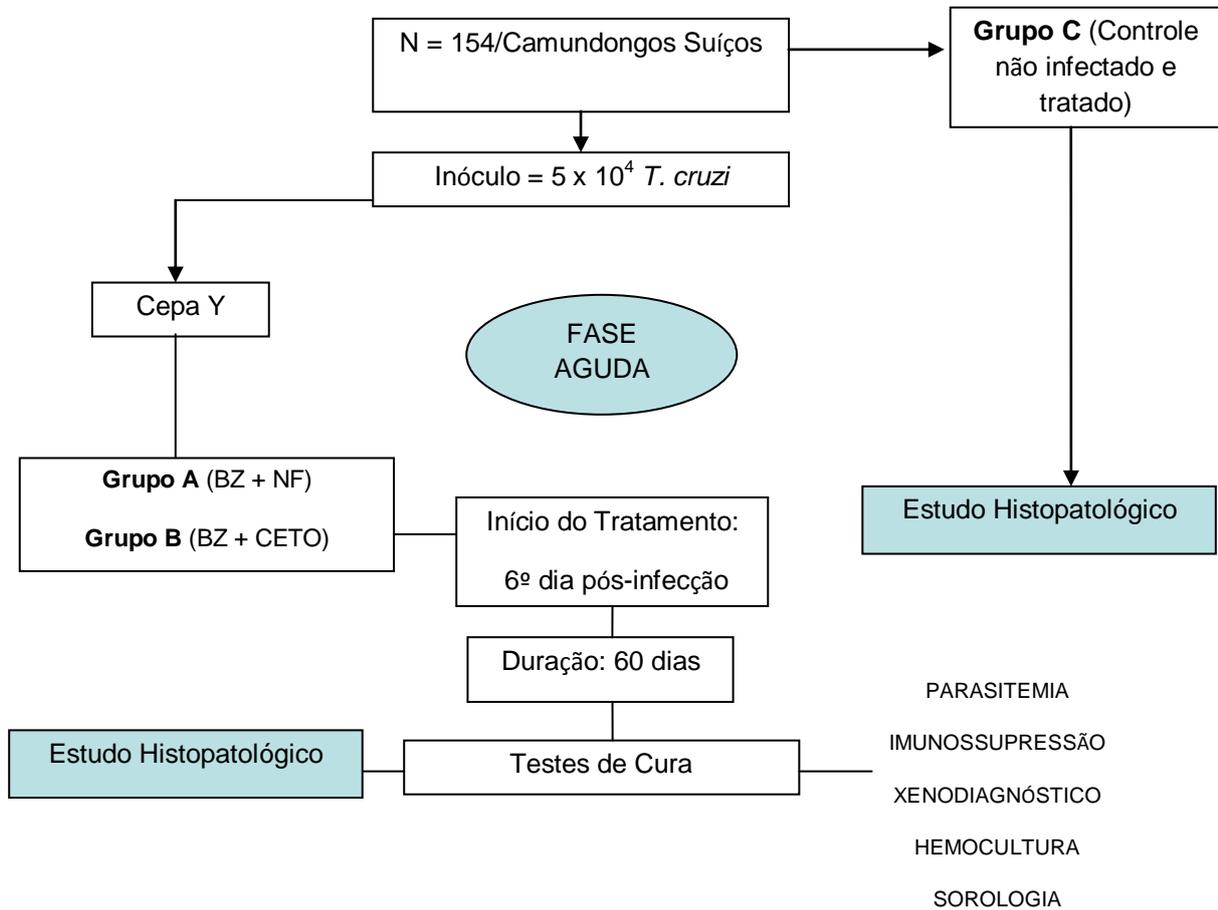
5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com o benzonidazol (BZ) associado aos medicamentos nifurtimox (NF) e cetoconazol (CETO), em combinações binárias, sobre o curso da infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos Suíços, durante a fase aguda da doença de Chagas.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar isoladamente, o efeito das doses do BZ, NF e CETO, em animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e em animais não infectados;
- Testar as combinações, BZ + NF e BZ + CETO, em animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e em animais não infectados e avaliar sua eficácia em comparação com a administração isolada do BZ;
- Submeter os camundongos dos diversos grupos experimentais aos testes de cura parasitológicos (parasitemia, xenodiagnóstico e hemocultura);
- Análise histopatológica do coração e músculo esquelético de todos os camundongos sobreviventes pós-tratamento;
- Determinar a titulação de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais pelo método da imunofluorescência indireta (IFI).

6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 ANIMAL EXPERIMENTAL

Foram utilizados 154 camundongos Suíços albinos, não isogênicos e de ambos os sexos e com média de idade entre 21 e 28 dias. Os animais foram criados e mantidos, em gaiolas com no máximo 5 animais, com água e ração comercial balanceada ad libitum no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) /Fiocruz/BA.

7.2 CEPA DO *T. cruzi*

Foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi* que apresenta susceptibilidade ao tratamento com o benzonidazol (ANDRADE *et al.*, 1985). Essa cepa vem sendo mantida através de passagens sucessivas em camundongos, em meio de cultura acelular e criopreservação no Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI) do CPqGM.

7.3 CÁLCULO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO

Para infectar os camundongos, com a referida cepa, utilizou-se o sangue de animais previamente infectados com a mesma. Dessa forma, o sangue para o cálculo do inóculo, foi obtido desses animais por secção dos vasos do plexo axilar, após anestesia com Xilasina e Ketamina. O cálculo do número total de parasitos, 5×10^4 formas tripomastigotas sanguícolas para cada animal, foi realizado de acordo com o método de Pizzi e Prager (1952), modificado por Brener (1961). Após o cálculo do inóculo cada animal recebeu pela via intraperitoneal, 0,1 mL de sangue contendo 5×10^4 formas tripomastigotas sanguícolas. A infecção foi confirmada em todos os animais através do exame de sangue a fresco, coletado da veia caudal, e analisado com o uso do microscópio óptico (aumento de 400x).

7.4 FÁRMACOS

Foram utilizados os seguintes fármacos:

Benzonidazol - ([2-nitro-N-(fenilmetil)-1 H-imidazol-1-acetamida]) [Produzido pelo Lafepe, laboratório farmacêutico do Estado de Pernambuco S/A, Recife/PE, Brasil];

Nifurtimox - ([N-(3-metil-1,1-dioxido-1,4-thiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2fúril)metanimina]) [Lampit[®], produzido pelo Bonima S/A em El Salvador, para Bayer S/A, Alemanha];

Cetoconazol - (1-[4-[4-[[[(2S,4R)-2-(2,4-diclorofenil)-2-(imidazol-1-il-metil)-1,3 dioxolano-4-il]metoxil]fenil]piperazina-1-il]etanona) [Produzido pelo laboratório EMS S/A, São Paulo/SP, Brasil].

7.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

7.5.1 Grupos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (Experimentos A e B)

EXPERIMENTO A (Número total de animais: **N = 76**)

Grupos

A 1 - Controles não tratados (n = 19);

A 2 - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ (n = 19);

A 3 - Tratados inicialmente com quatro doses de 200 mg/kg/dia de NF, seguido de 50 mg/kg/dia de NF até o fim do tratamento (n = 19);

A 4 - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ + NF (tratados inicialmente com quatro doses de 200 mg/kg/dia de NF, seguido de 50 mg/kg/dia de NF até o fim do tratamento) (n = 19).

EXPERIMENTO B (Número total de animais: N = 48)

Grupos

- B 1** - Controles não tratados (n = 5);
- B 2** - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ (n = 5);
- B 3** - Tratados com 120 mg/kg/dia de CETO (n = 19);
- B 4** - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ + 120 mg/kg/dia de CETO (n = 19).

7.5.2 Grupo não infectado (Experimento C)

EXPEIMENTO C (Número total de animais: N = 30)

Grupos

- C 1** - Controles não tratados (n = 5);
- C 2** - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ (n = 5);
- C 3** - Tratados inicialmente com quatro doses de 200 mg/kg/dia de NF, seguido de 50 mg/kg/dia de NF até o fim do tratamento (n = 5);
- C 4** - Tratados com 120 mg/kg/dia de CETO (n = 5);
- C 5** - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ + NF (tratados inicialmente com quatro doses de 200 mg/kg/dia de NF, seguido de 50 mg/kg/dia de NF até o fim do tratamento) (n = 5);
- C 6** - Tratados com 100 mg/kg/dia de BZ + 120 mg/kg/dia de CETO (n = 5).

8. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

8.1 ESQUEMA TERAPÊUTICO

Os medicamentos foram administrados diariamente por via intragástrica, a partir do 6º dia pós infecção (**experimentos A e B**). Os comprimidos foram macerados e ressuspensos em solução de goma arábica a 4%, obtendo-se uma concentração de

100 mg/kg de BZ, 200 mg e 50 mg/kg de NF (inicialmente foram administrados 4 doses de 200 mg/kg/dia e em seguida 50 mg/kg/dia até o fim do tratamento) e 120 mg/kg de CETO. Em cada experimento, o tratamento teve duração de 60 dias (**experimentos A, B e C**). Nos subgrupos que receberam as combinações dos medicamentos o BZ foi administrado em primeiro lugar e 2 horas depois foram administrados os outros fármacos. Os animais de cada subgrupo eram pesados quinzenalmente, em média, para que recebessem a referida dose de acordo com seu peso corporal.

8.2 PARASITEMIA

Foi avaliada diariamente a partir do 6º dia após a infecção em microscópio óptico pelo exame direto, entre lâmina e lamínula, do sangue periférico obtido pela secção da cauda de cada animal infectado (5 camundongos por grupo dos experimentos A e B). A contagem dos parasitos foi realizada em 50 campos microscópicos (aumento de 400X) e a média ponderada dos cinco animais de cada grupo foi determinada (ANDRADE, 1974). A análise da parasitemia foi realizada até o final do período de tratamento.

8.3 MORTALIDADE

Foi acompanhada diariamente durante todo o curso da infecção em todos os grupos experimentais e determinada através da mortalidade cumulativa após fim do tratamento.

8.4 CRITÉRIO E TESTES DE CURA PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO

8.4.1 Critério de cura

A cura pós-tratamento foi determinada a partir da combinação dos testes parasitológicos e sorológico. Todos os animais que apresentaram os testes parasitológico e sorológico negativos foram considerados curados.

8.4.2 Testes de cura parasitológicos

Trinta dias após o término do tratamento os camundongos sobreviventes (**experimentos A e B**) foram inicialmente submetidos aos testes de cura parasitológicos (parasitemia, xenodiagnóstico e hemocultura) com o objetivo de detectar a presença do *T. cruzi*. Os animais que apresentaram os três testes de cura parasitológicos negativos, foram considerados curados parasitologicamente.

8.4.2.1 Parasitemia

Foi realizada através do exame direto do sangue periférico, coletado da cauda de cada animal, entre lâmina e lamínula com auxílio de um microscópio óptico. Os camundongos que apresentaram parasitemia negativa ao exame direto da amostra de sangue foram imunossuprimidos com alta dose de Ciclofosfamida (250 mg/kg). Após a administração da primeira dose de Ciclofosfamida, a parasitemia foi acompanhada durante uma semana, e aqueles animais que permaneceram com parasitemia negativa foram submetidos a uma segunda dose de Ciclofosfamida e a parasitemia foi acompanhada por mais uma semana.

8.4.2.2 Xenodiagnóstico

Para realização do xenodiagnóstico foram utilizadas, para cada animal, cinco ninfas de III e IV estágios não infectadas com o *T. cruzi*, da espécie *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) que foram acondicionadas em recipientes apropriados cobertos com nylon na parte superior. Dessa forma, os animais foram imobilizados

em sacos constituídos com telas e colocados em decúbito dorsal, sendo as ninfas, então colocadas sobre o abdômen de cada animal, por um período de 20 minutos. Após 45 dias da preparação, as ninfas tiveram seus abdomens comprimidos para a obtenção do conteúdo biológico, os quais foram examinados em 50 campos microscópicos, com aumento de 400X, para detecção das formas parasitárias. Os animais que ainda apresentavam parasitemia negativa foram eutanaziados e amostras de sangue foram coletadas para a realização dos testes de hemocultura e reação de imunofluorescência indireta (IFI). Além disso, o coração e o músculo esquelético foram coletados e submetidos ao estudo histopatológico.

8.4.2.3 Hemocultura

As amostras de sangue coletadas foram semeadas em tubo de ensaio contendo meio Warren (WARREN, 1960) e mantida a 37°C. Para a detecção do *T. cruzi*, foram feitos exames microscópicos das culturas até 90 dias de cultivo.

8.4.3 Teste Sorológico: Reação de imunofluorescência indireta (IFI)

O soro coletado foi estocado a uma temperatura de -20°C para titulação de anticorpos específicos pela técnica de imunofluorescência indireta (CAMARGO, 1966). Para a titulação dos anticorpos foram preparadas diluições seriadas do soro, em PBS (solução salina tamponada), utilizando placas de múltiplos poços e de fundo arredondado. Após essa etapa o volume de 10 µL das diluições de cada poço foi distribuído nas lâminas contendo o antígeno. O antígeno utilizado foi constituído por formas de cultura em meio Warren, fixadas em formol e em seguida distribuídas em lâminas apropriadas, que foram tratadas com IgG anti-camundongo, ligado à fluoresceína. A titulação dos anticorpos foi feita pela diluição progressiva do soro, nos Títulos de 1:10 , 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. Em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por um período de 30 minutos. Passado o período de incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens sequenciais com PBS, pH 7.4, por um período de 5 minutos em cubetas próprias e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram aplicadas 10 µL do anticorpo IgG anti-camundongo conjugado ligado à fluoresceína (Sigma), sobre cada poço de

cada lamina sendo em seguida incubadas a 37°C na estufa por mais 30 minutos em câmara úmida. Retiradas da estufa após o período de incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens seguidas com PBS de 5 minutos, secadas e montadas com tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9.6 (0,02M) e analisadas no microscópio Zeiss de epifluorescência com lâmpada halogênica. Foi realizado o teste de IFI quantitativo, sendo consideradas positivas, ponto de corte, as reações fluorescentes em soros com diluição $\geq 1:40$, conforme recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

8.5 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

O estudo histopatológico foi realizado nos três experimentos realizados (A, B e C), sendo que nos experimentos A e B os camundongos foram eutanaziados 30 dias após o fim do tratamento (com exceção de seis animais do grupo controle do experimento A, que foram eutanaziados no 6º dia pós-infecção) e no experimento C após 26 dias de tratamento. De todos os animais que foram eutanaziados, coletou-se o coração e o músculo esquelético, os quais foram fixados em Formol a 10%. Posteriormente, realizaram-se secções, inclusão em parafina e coloração em hematoxilina e eosina (H&E) para o estudo histopatológico. O objetivo do estudo histopatológico foi para comparar a intensidade das lesões fibrótico-inflamatórias do miocárdio e do músculo esquelético entre os animais tratados somente com benzonidazol com os tratados com a associação dos medicamentos. Foi feita uma análise semi-quantitativa onde a intensidade das lesões inflamatórias foi expressa em +, ++ e +++ com a seguinte correspondência: (+) lesão discreta, correspondendo a escasso e difuso infiltrado mononuclear e/ou pequenos focos de infiltração mononuclear; (++) lesão moderada, representada por difuso infiltrado mononuclear mais acentuado do que no grau + e focos inflamatórios localizados, com lesão focal de miócito; (+++) lesão intensa que corresponde a denso infiltrado difuso e/ou infiltrados focais extensos e confluentes e a necrose de miócitos.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações das parasitemias e da mortalidade cumulativa nos grupos tratados com BZ e as associações deste com o NF e com o CETO, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. O programa utilizado foi o Software GraphPad Prism, versão 5. As diferenças foram consideradas significativas se o valor de p foi menor que 0,05.

10. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização dos referidos procedimentos, com os camundongos, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e uso de animais de Laboratório (CEUA) do CPqGM (CEUA N: 004/2010; ID: 522). Todas as atividades relacionadas ao uso e manipulação desses animais estiveram de acordo com as normas éticas exigidas pela CEUA.

11. RESULTADOS

De acordo com os objetivos do presente trabalho, foram realizados três grupos experimentais (**A, B e C**), e os resultados estão representados em forma de figuras e tabelas:

EXPERIMENTO A (Número total de animais: **N = 76**)

11.1 PARASITEMIA E MORTALIDADE CUMULATIVA

A parasitemia e a mortalidade cumulativa foram avaliadas do 6º dia pós-infecção até o último dia de tratamento. Os resultados estão representados em curvas de parasitemia (**Figura 2**) e de mortalidade cumulativa (**Figura 3**). A Figura 2 mostra o pico parasitêmico do grupo Controle, no 10º dia pós-infecção, característico da cepa Y. Nos grupos dos animais tratados a negativação da parasitemia ocorreu a partir do 8º dia (grupo BZ), 10º dia (grupo NF) e 7º dia pós-infecção (grupo BZ + NF) e permaneceram da mesma forma até o fim do tratamento. A análise estatística indicou que não houve diferença significativa entre o grupo BZ e o grupo BZ + NF ($p = 0,5742$). Por outro lado, a **Figura 3**, indica a mortalidade de 100% dos animais do grupo Controle, no 12º dia pós-infecção. Nos grupos BZ e BZ + NF o índice de mortalidade foi de 5,26% (correspondente a um óbito), sendo que no grupo BZ o óbito foi no 26º dia e no grupo BZ + NF no 11º dia pós-infecção. No grupo NF a taxa de mortalidade foi de 0%. De acordo com as taxas de mortalidade obtidas não foi observado diferença estatística entre os grupos BZ e BZ + NF ($p = 0,2609$).

PARASITEMIA

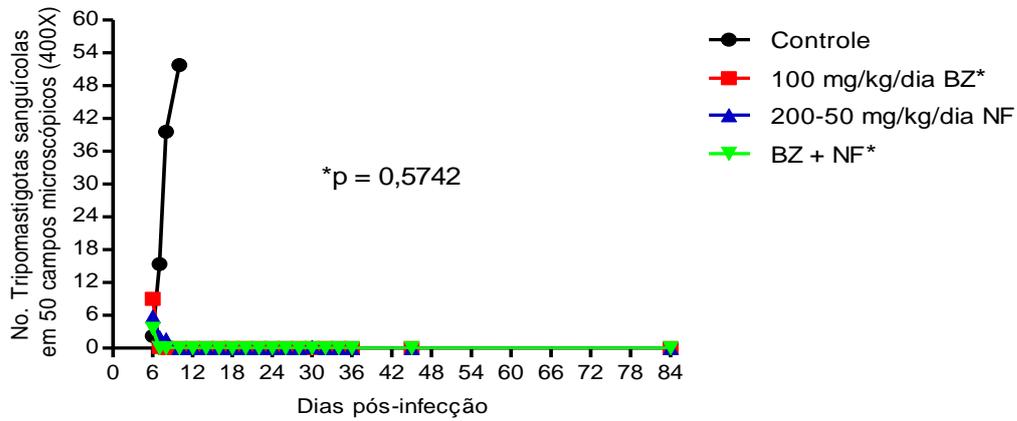


FIGURA 2: Níveis parasitêmicos em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ou não ao tratamento com Benzonidazol (BZ) e/ou Nifurtimox (NF) (*Teste Mann Whitney; $p < 0.05$; comparação do grupo BZ vs BZ + NF).

MORTALIDADE CUMULATIVA

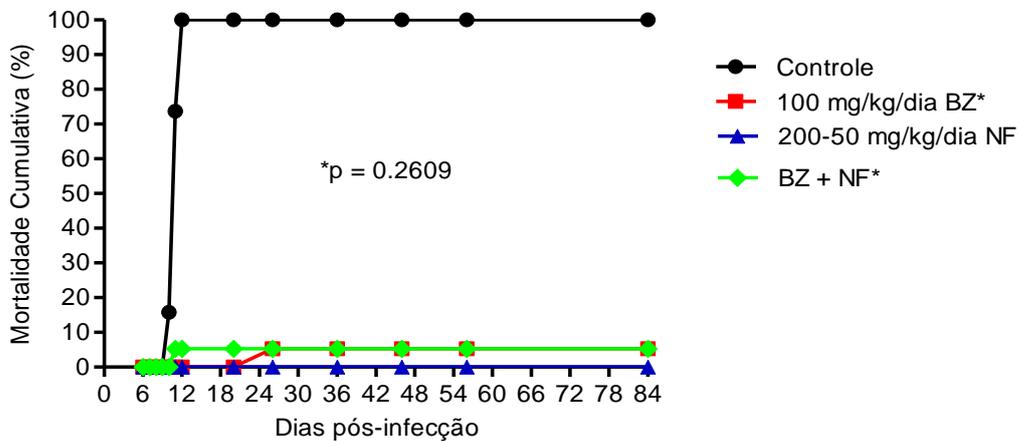


FIGURA 3: Mortalidade Cumulativa (%) em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ou não ao tratamento com Benzonidazol (BZ) e/ou Nifurtimox (NF) (*Teste Mann Whitney; $p < 0.05$; comparação do grupo BZ vs BZ + NF).

11.2 TESTES DE CURA PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO

Os testes de cura foram realizados em todos os animais sobreviventes 30 dias após o fim do tratamento. Inicialmente foram realizados os testes de cura parasitológicos (parasitemia, xenodiagnóstico e hemocultura), o teste sorológico através da imunofluorescência indireta (IFI) (**Tabelas 1, 2 e 3**) e em seguida foi determinado o índice de cura (**Tabela 4**). Os índices de cura parasitológicos foram os seguintes: grupo BZ (93.75%), grupo NF (31.6%) e grupo BZ + NF (90%). Os camundongos sobreviventes aos testes de cura parasitológicos e que ainda permaneciam com parasitemia negativa, foram submetidos ao teste sorológico. Nesse caso, foi observado um índice de cura de 85,7% no grupo BZ (o menor título foi 1/10 e o maior 1/160), 16,7% no grupo NF (o menor título foi 1/20 e o maior foi de 1/1280) e 100% no grupo BZ + NF (menor título 1/10 e o maior título 1/20). O índice de cura geral foi determinado a partir da combinação dos testes parasitológicos e sorológico: grupo BZ (80,0%), grupo NF (5,26%) e grupo BZ + NF (100%) (**Tabela 4**).

Tabela 1 Resultados dos testes de cura parasitológicos e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
BZ / 1	NEG	NEG	NEG	1:20
BZ / 2	NEG	NEG	NEG	1:20
BZ / 3	NEG	NEG	*	*
BZ / 5	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ / 6	NEG	POS	POS	1:80
BZ / 7	NEG	NEG	NEG	1:40
BZ / 8	NEG	NEG	NEG	1:20

BZ / 9	NEG	*	*	*
BZ / 10	NEG	*	*	*
BZ / 11	NEG	NEG	NEG	1:160
BZ / 12	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ / 13	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ / 14	NEG	NEG.	NEG	NEGATIVO
BZ / 15	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ / 16	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ / 17	NEG	NEG.	NEG	1:10
BZ / 18	NEG.	NEG	NEG	1:10

*Óbito

Tabela 2 Resultados dos testes de cura parasitológicos e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados inicialmente com 200 mg/kg/dia e posteriormente com 50 mg/kg/dia de nifurtimox (NF).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
NF / 1	POS	*	*	*
NF / 2	POS	POS	NEG	NR
NF / 3	POS	POS	NEG	NR
NF / 4	NEG	NEG	NEG	1:1280
NF / 5	POS	NEG	NEG	NR

NF / 6	NEG	POS	NEG	NR
NF / 7	NEG	NEG	NEG	1/320
NF / 8	NEG	POS	NEG	NR
NF / 9	POS	POS	NEG	NR
NF / 10	NEG	NEG	NEG	1:160
NF / 11	POS	NEG	NEG	NR
NF / 12	NEG	NEG	NEG	1:160
NF / 13	POS	NEG	NEG	NR
NF / 14	NEG	NEG	NEG	1:20
NF / 15	NEG	POS	NEG	NR
NF / 16	POS	POS	NEG	NR
NF / 17	NEG.	NEG	NEG	1:160
NF / 18	POS	NEG	NEG	NR
NF / 19	POS	POS	NEG	NR

*Óbito

NR – Não realizado

Tabela 3 Resultados dos testes de cura parasitológicos e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol em combinação com 200/50 mg/kg/dia de nifurtimox (BZ + NF).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
BZ + NF / 1	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + NF / 2	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + NF / 3	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + NF / 4	NEG	NEG	NEG	1:10

BZ + NF / 5	NEG	NEG	NEG	1:20
BZ + NF / 6	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + NF / 7	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + NF / 8	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + NF / 9	NEG	*	*	*
BZ + NF / 10 Grupos	NEG	Pos / Total	*	Índices de cura (%)
BZ + NF / 11 BZ	NEG	NEG _{3/15}	NEG	1:10 80
BZ + NF / 12 NF	NEG	NEG _{18/19}	NEG	NR 5,26
BZ + NF / 13	NEG	*	*	*
BZ + NF / 14 BZ + NF	NEG	0/10	*	100 *
BZ + NF / 15	NEG	*	*	*
BZ + NF / 16	NEG	*	*	*
BZ + NF / 17	POS	*	*	*
BZ + NF / 18	NEG	*	*	*

*Óbito

NR – Não realizado

Tabela 4 Índices de cura, de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ), 200/50 mg/kg/dia de nifurtimox (NF) e benzonidazol em combinação com nifurtimox (BZ + NF) baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológico.

11.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Trinta dias após o fim do tratamento, quando os animais sobreviventes (com exceção do grupo Controle, no qual seis animais foram eutanaziados no 6º dia pós-

infecção) foram eutanaziados para a realização dos testes de cura, foram coletados o coração e o músculo esquelético para serem submetidos ao estudo histopatológico. Foram feitas análises de cada grupo as quais estão também representadas nas figuras 4 e 5.

11.3.1 CONTROLE INFECTADO E NÃO TRATADO

Nesse caso, foram analisados seis animais sacrificados no 6º dia pós-infecção e um animal com óbito no 11º dia pós-infecção. Foi observado no miocárdio, nos animais do 6º dia pós-infecção, infiltrado intersticial difuso de células mononucleares, variando de discreto a moderado, e áreas focais de adensamento com discreto número de ninhos parasitários (Figura 4 A). Em um caso examinado, no 11º dia pós-infecção, observou-se intenso parasitismo no miocárdio (Figura 4 B).

11.3.2 INFECTADOS E TRATADOS COM BENZONIDAZOL

Foram observados em 7/14 casos lesões inflamatórias focais e discretas em miocárdio (Figuras 4 C e 4 D). O músculo esquelético estava sem nenhuma alteração, com exceção de um caso em que foi visto infiltrados mononucleares focais e difusos, mas discretos.

11.3.3 INFECTADOS E TRATADOS COM NIFURTIMOX

Foram analisados 17 casos, nos quais detectou-se alterações inflamatórias focais e difusas no coração, predominando em átrios e variando de discretas a moderadas com raros focos de necrose de fibras cardíacas e presença de áreas focais de fibrose (Figura 5 A). O músculo esquelético apresentava lesões perivasculares com densos infiltrados mononucleares, com envolvimento de feixe vículo-nervoso intersticial, variando de discreta a intensos (Figura 5 B). Em um caso foi visto ninho parasitário.

11.3.4 INFECTADOS E TRATADOS COM BENZONIDAZOL + NIFURTIMOX

Apenas 2/8 casos mostraram infiltrados inflamatórios em átrios (Figuras 5 C e 5 D). O músculo esquelético não mostrou alterações.

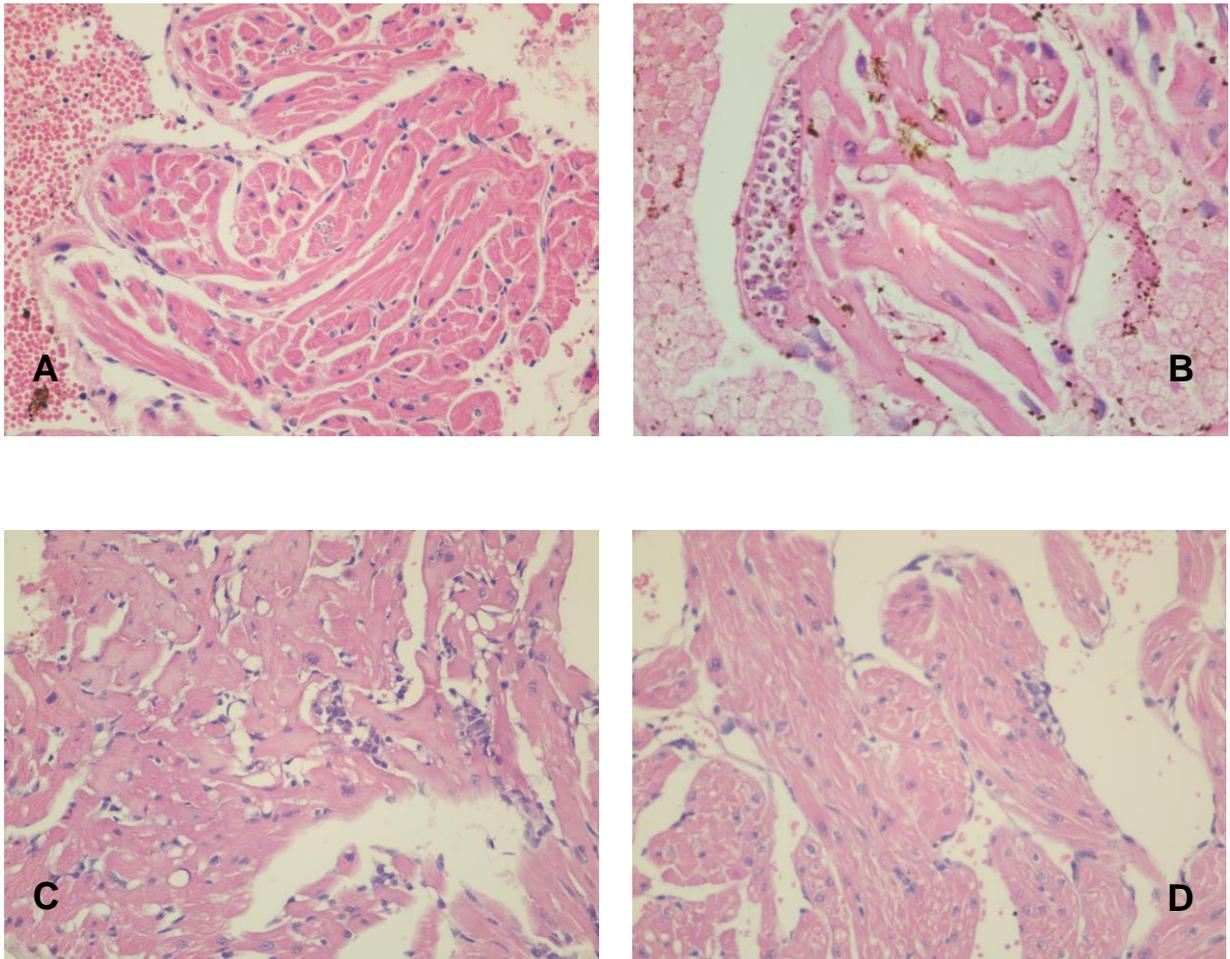


Figura 4: Secções de coração de camundongos controles infectados com a cepa Y e não tratados: **A** – Miocárdio: Infiltrado focal mononuclear; presença de pequenos ninhos parasitários (6^o dia pós-infecção). 100x. **B** – Secção de átrio observando-se numerosos ninhos parasitários no interior de miocélulas cardíacas (11^o dia). 400 X. **C e D** – **Tratados com BZ**, **C** – Secção de miocárdio atrial com infiltrados focais de células mononucleares. 400x. **D** – Parede atrial com infiltrados focais mononucleares. 400x.

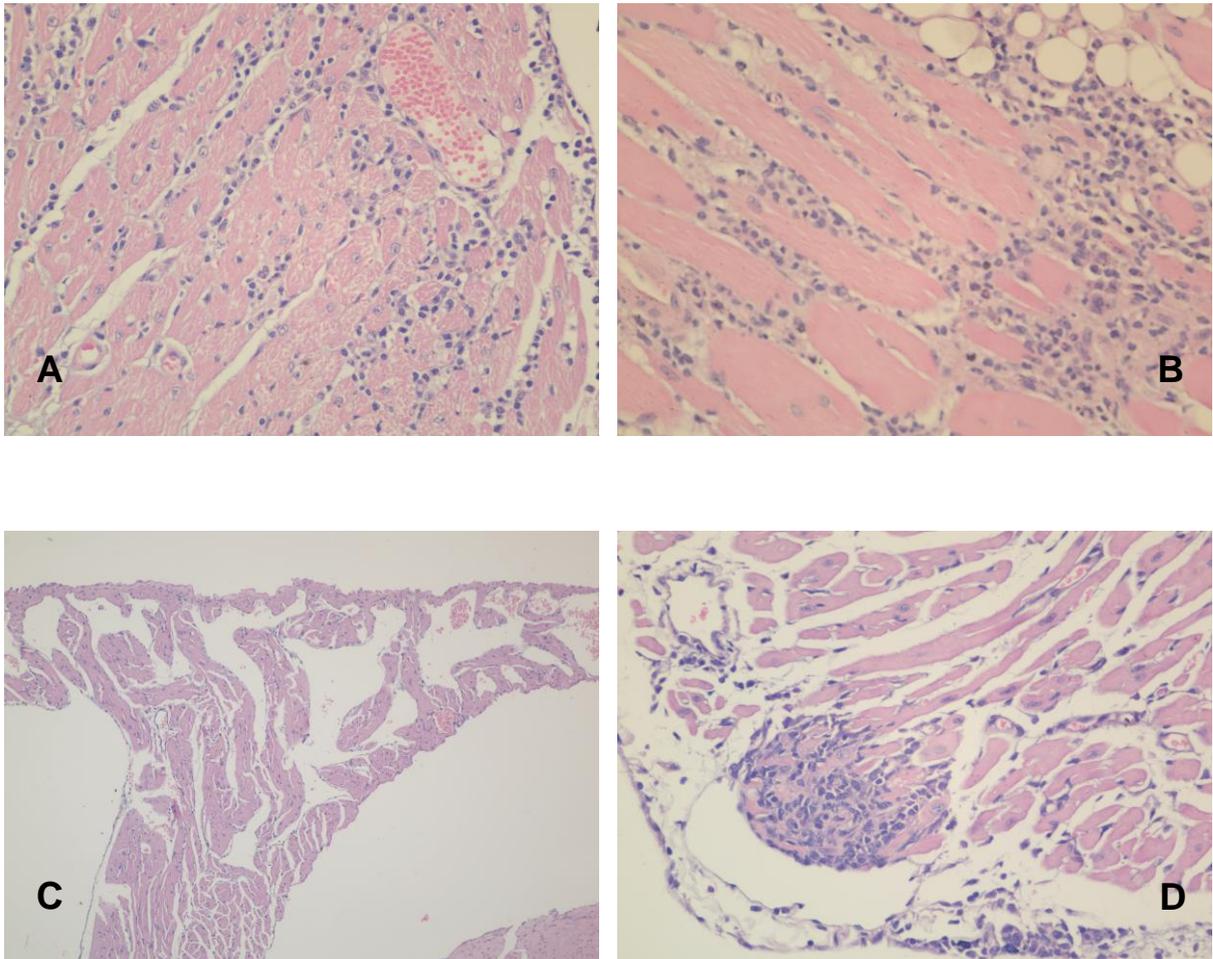


Figura 5: Secções de coração de camundongos infectados e tratados com **NF** **A, B** – **A:** Secção de miocárdio com infiltrado intersticial mononuclear, moderado e difuso. 400x. **B** – Secção de músculo esquelético com infiltrado mononuclear, moderado a intenso. 400x. **Tratados com BZ + NF, C e D** – **C** – Aspecto panorâmico do átrio com discreto infiltrado mononuclear. 100x. **D** – Secção de átrio, com área focal de necrose de miocelulas cardíacas e denso infiltrado focal mononuclear. 400x.

EXPERIMENTO B (Número total de animais: **N = 48**)

11.4 PARASITEMIA E MORTALIDADE CUMULATIVA

Assim como no experimento A, a parasitemia e a mortalidade cumulativa foram avaliadas do 6º dia pós-infecção até o último dia de tratamento. Os resultados estão representados em curvas de parasitemia (Figura 7) e de mortalidade cumulativa (Figura 8). Os animais do grupo Controle apresentaram um pico parasitêmico no 10º dia pós-infecção e nos grupos dos animais tratados a negatificação da parasitemia ocorreu a partir do 8º dia (grupos BZ e BZ + CETO) e 11º dia (grupo CETO) e permaneceram da mesma forma até o fim do tratamento (Figura 7). A análise estatística indicou que não houve diferença estatística significativa entre o grupo BZ e o grupo BZ + CETO ($p = 1$). A taxa de mortalidade (Figura 8) indica a mortalidade de 100% dos animais do grupo Controle, no 14º dia pós-infecção. Nos grupos BZ e CETO o índice de mortalidade foi de 0% e no subgrupo BZ + CETO a taxa de mortalidade foi de 5,26% (ocorreram três óbitos durante o processo de entubação, portanto não foram incluídos na taxa de mortalidade, 5,26% é a taxa de apenas um óbito). As taxas de mortalidade não indicaram diferença estatística entre os grupos BZ e BZ + CETO ($p = 0,107$).

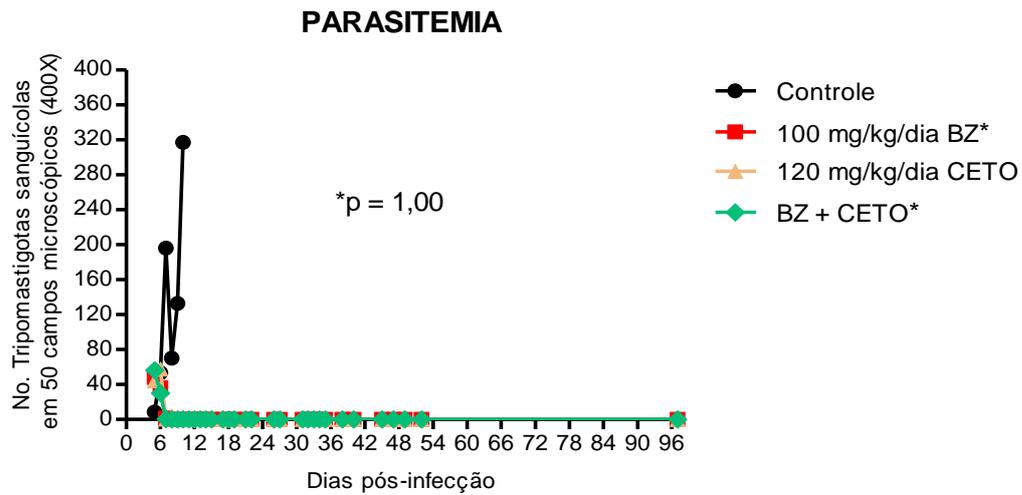


FIGURA 6: Níveis parasitêmicos em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com Benzonidazol (BZ) e/ou Cetoconazol (CETO) (*Teste Mann Whitney; $p < 0.05$; comparação do grupo BZ vs BZ + CETO).

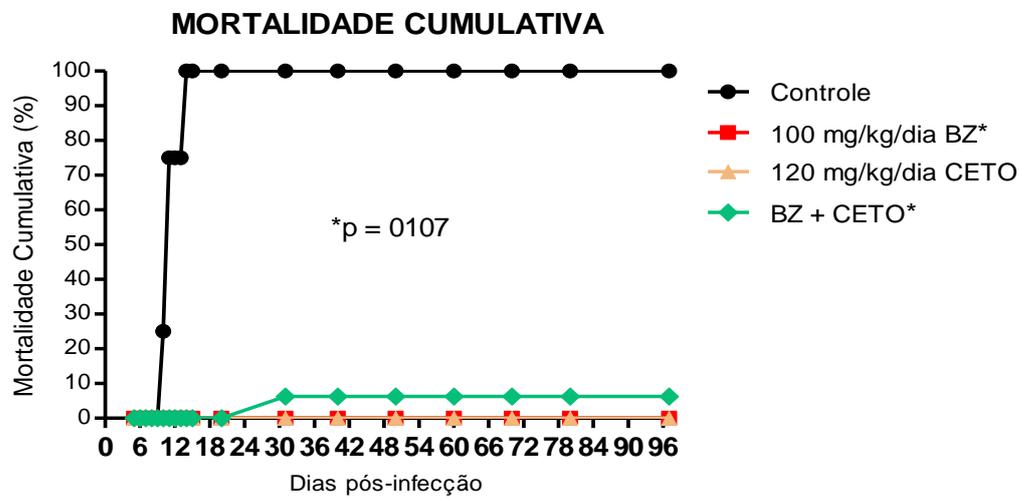


FIGURA 7: Mortalidade Cumulativa (%) em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com Benzonidazol (BZ) e/ou Cetoconazol (ceto) (*Teste Mann Whitney; $p < 0.05$; comparação do grupo BZ vs BZ + NF).

11.5 TESTES DE CURA PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO

Os testes de cura foram realizados seguindo os mesmos parâmetros do experimento A e estão representados nas tabelas 5, 6, 7 e 8. Nos grupos BZ e BZ + CETO o índice de cura parasitológico foi de 100% e no grupo CETO o índice foi de 94,73%. O teste sorológico (IFI) revelou um índice de cura de 80% no grupo BZ (o menor título foi 1/10 e o maior 1/40), 90% no grupo CETO (o menor título foi 1/10 e o maior foi de 1/160) e no grupo BZ + CETO o índice de cura foi de 100% (menor título 1/10) (Tabela 6). O índice de cura geral foi determinado a partir da combinação dos testes parasitológicos e sorológico: BZ (80,0%), CETO (81,8%) e BZ + CETO (100%) (Tabela 8).

Tabela 5 Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
BZ / 1	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ / 2	NEG	NEG	NEG	1:40
BZ / 3	NEG	NEG	NEG	1:20
BZ / 4	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ / 5	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO

Tabela 6 Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 120 mg/kg/dia de cetoconazol (CETO).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
CETO / 1	NEG	*	*	*
CETO / 2	NEG	NEG	*	*
CETO / 3	NEG	*	*	*
CETO / 4	NEG	NEG	*	*
CETO / 5	NEG	NEG	NEG	1:20
CETO / 6	NEG	NEG	NEG	1:10
CETO / 7	NEG	*	*	*
CETO / 8	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
CETO / 9	NEG	*	*	*
CETO / 10	NEG	*	*	*
CETO / 11	POS	NEG	NEG	NEGATIVO
CETO / 12	NEG	NEG	*	*
CETO / 13	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
CETO / 14	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
CETO / 15	NEG	NEG	NEG	NR
CETO / 16	NEG	NEG	NEG	1:20
CETO / 17	NEG.	NEG	NEG	1:20
CETO / 18	NEG	NEG	NEG	1:160
CETO / 19	NEG	NEG	NEG	1:10

*Óbito

NR – Não realizado

Tabela 7 Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol em combinação com 120 mg/kg/dia de cetoconazol (BZ + CETO).

Grupos Código	Parasitológico			Índices de cura (%)
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI - Títulos
BZ + CETO / 1	NEG	*	*	*
BZ + CETO / 2	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + CETO / 3	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + CETO / 4	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + CETO / 5	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + CETO / 6	NEG	*	*	*
BZ + CETO / 7	NEG	*	*	*
BZ + CETO / 8	NEG	NEG	NEG	NEGATIVO
BZ + CETO / 9	NEG	NEG	*	*
BZ + CETO / 10	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + CETO / 11	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + CETO / 12	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + CETO / 13	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + CETO / 14	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ + CETO / 15	NEG	*	*	*

*Óbito

Tabela 8 Índices de cura, de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ), 120 mg/kg/dia de cetoconazol (CETO) e benzonidazol em combinação com cetoconazol (BZ + CETO) baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológicos.

BZ	1/5	80
CETO	2/11	81,8
BZ + CETO	0/10	100

11.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Trinta dias após o fim do tratamento, quando os animais foram eutanaziados para a realização dos testes de cura, foram coletados o coração e o músculo esquelético para serem submetidos ao estudo histopatológico. Foram feitas análises de cada grupo as quais estão representadas na **figura 8**.

11.6.1 INFECTADOS E TRATADO COM BENZONIDAZOL

Em 3/5 dos camundongos estudados havia discretos infiltrados focais no átrio (**Figuras 8 A e 8 B**). Em dois casos o infiltrado apresentou um grau moderado com necrose de fibra cardíaca. O músculo esquelético não mostrou alterações.

11.6.2 INFECTADOS E TRATADOS COM CETOCONAZOL

Dos 11 casos estudados, oito mostraram presença de infiltrados inflamatórios variando de discretos a moderados sendo que em um caso havia lesão extensa em ventrículo com destruição de fibras cardíacas e substituição por infiltrado mononuclear e fibrose (**Figura 8 C**). Em três casos não foram vistas alterações no miocárdio. O músculo esquelético estava sem alterações em sete casos, porém apresentou infiltrados mononucleares perivasculares em dois casos, em um dos quais foi detectado um grande ninho parasitário (**Figura 8 D**).

11.6.3 INFECTADOS E TRATADOS COM BENZONIDAZOL + CETOCONAZOL

Em 9/13 casos apresentaram infiltrados inflamatórios focais ou difusos e com discreta fibrose intersticial no miocárdio (**Figuras 8 E e 8 F**). Em quatro casos não foram vistas alterações e o músculo esquelético não apresentou alterações.

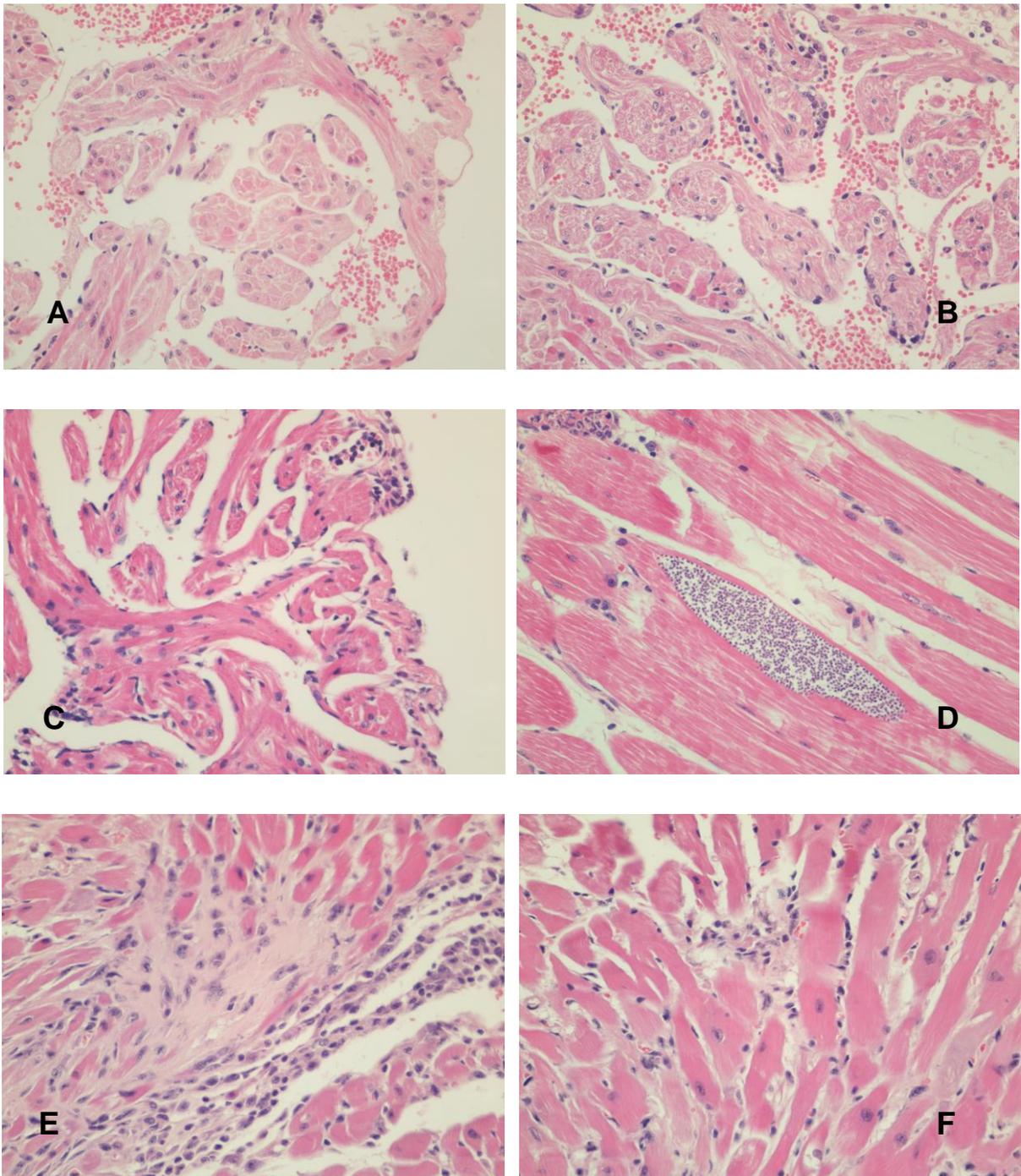


Figura 8: Secções de miocárdio de camundongos infectados e **tratados com BZ**, **A e B** – Infiltrado mononuclear difuso e discreto em átrio. 400x. **Tratados com CETO**, **C e D** – **C** – Parede atrial com moderado e difuso infiltrado mononuclear com adensamento subepicárdico. 400x. **D** – Secção de músculo esquelético com grande ninho parasitário com formas amastigotas do *T. cruzi*. 400x. **Tratados com BZ + CETO**, **E, F** – secções de ventrículo: **E** – área de acentuado infiltrado mononuclear intersticial e fibrose. 400x. **F** – necrose focal e infiltrado mononuclear difuso. 400x.

GRUPO C (Número total de animais: **N = 30**)

Os resultados do experimento C foram baseados no estudo histopatológico. Para coletar o coração e o músculo esquelético, os animais foram eutanaziados após 26 dias de tratamento.

11.7 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Alterações inespecíficas isoladas como vacuolização citoplasmática (**Figura 9 A, B, C, D e E**), necrose de fibras cardíacas, discretos infiltrados focais pericapilares e hipertrofia de núcleo das células foram vistos em 6/10 casos (foram analisados dois animais de cada grupo). Em 4/10 casos não houve alterações.

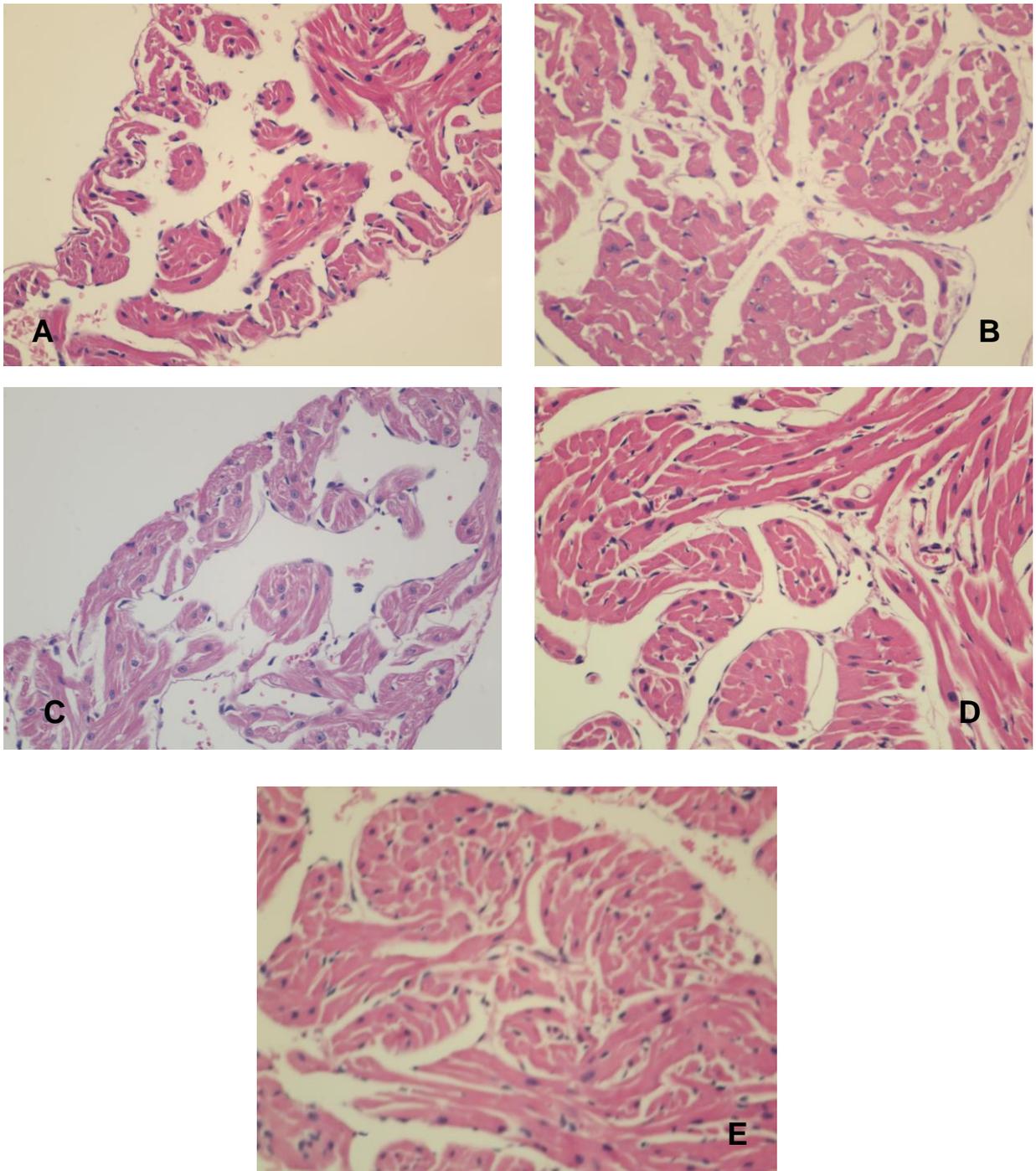


Figura 9 – Aspectos do miocárdio em camundongos controles não infectados e tratados com cada droga: **A** – BZ; **B** - NF; **C** – CETO; **D** - BZ+NF; **E** – BZ+CETO. Secções de átrio com discreto grau de vacuolização de miocelulas cardíacas. 400x.

12. DISCUSSÃO

Os temas centrais abordados no presente estudo levam em consideração os recentes apelos da comunidade científica de diversos países, reunida sob o patrocínio da DNDi (Drugs for neglected diseases), criada em 2003 por Médicos sem Fronteiras, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e outras instituições internacionais (*).

A DNDi ao levantar o problema da necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das doenças negligenciadas, leva também em conta a necessidade de novos estudos sobre as drogas já em uso clínico para o tratamento da doença de Chagas, como o Benzonidazol (BZ) e o Nifurtimox (NF) e os testes com os compostos azólicos, ou outros compostos.

A necessidade de novos estudos com o BZ e o NF evidencia que a disponibilidade de medicamentos para o tratamento da doença de Chagas é extremamente limitada. Segundo Coura (2009), as drogas não são acessíveis para os pacientes, o nifurtimox não está disponível no Brasil, ambas as drogas induzem efeitos colaterais importantes, algumas cepas do *T. cruzi* são resistentes aos medicamentos e, além disso, o tratamento na fase crônica ainda é controverso. Estudos de grande amplitude estão sendo desenvolvidos pelo Projeto BENEFIT (Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis), estudo multicêntrico internacional o qual tem o objetivo primário de estabelecer a eficácia do BZ administrado durante 60 dias, em reduzir a carga parasitária e mostrar se o tratamento etiológico pode reverter ou retardar a progressão da doença de Chagas.

Dessa forma, tanto do ponto de vista clínico como experimental, o tratamento da doença de Chagas continua sendo um desafio. Os medicamentos ou esquemas de tratamento devem ser capazes de combater eficazmente o *T. cruzi* na fase aguda, assim como na fase crônica, e promover a cura, caracterizada por resultados parasitológicos e sorológicos negativos (BRENER, 1962; ANDRADE *et al.*, 1987; URBINA *et al.*, 2007; ROMANHA *et al.*, 2008; APT, 2010).

(*) INFORMATIVO n.2 - Plataforma de Pesquisa Clínica em doença de Chagas, Rio de Janeiro/RJ/Brasil, Novembro de 2012.

Atualmente diversas linhas de pesquisas relacionadas à quimioterapia na doença de Chagas vêm buscando novos compostos ou esquemas terapêuticos alternativos. Nesse sentido, destaca-se o uso de medicamentos utilizados para o tratamento de diferentes doenças, e que apresentam ação anti-*T. cruzi*.

O exemplo disso são os antifúngicos, principalmente a classe dos compostos azólicos que apresentaram ação anti-*T. cruzi* in vitro e in vivo (McCABE *et al.*, 1983; MOREIRA *et al.*, 1992; URBINA *et al.*, 2007). Assim como para os fungos, a biossíntese de esteróides, como o ergosterol, é imprescindível para o ciclo de vida do *T. cruzi*. Estes compostos induzem parada de crescimento e perda da viabilidade celular em organismos sensíveis como consequência da depleção de esteróis fúngicos essenciais e/ou da acumulação de intermediários tóxicos. Um desses compostos, o posoconazol, foi ativo contra as cepas do *T. cruzi* resistentes ao BZ e NF e por isso é atualmente considerado um fármaco promissor para o tratamento da doença de Chagas (URBINA, 2002).

Outros estudos (COURA, 2009) têm estimulado o uso de tratamento combinado com diferentes drogas no sentido de potencializar o efeito anti-*T. cruzi* destas drogas, com ênfase no uso do BZ. Segundo Coura (2009), diversas doenças, como a tuberculose, a lepra e a AIDS só foram controladas depois que o esquema de tratamento dos pacientes passou a ser através de associações de medicamentos com diferentes mecanismos de ação. Dessa forma, os fármacos podem interagir de modo sinérgico diminuindo o desenvolvimento de resistência e da toxicidade para o hospedeiro.

De um modo geral, a combinação de fármacos já foi testada por inúmeros pesquisadores na infecção experimental pelo *T. cruzi*, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e/ou reduzir a intensidade de reações adversas (MALDONATO *et al.*, 1993). Araújo *et al* (2000), por exemplo, investigaram o efeito sinérgico da associação de alguns medicamentos em diferentes cepas do *T. cruzi*. Nesse caso, foi observado um efeito sinérgico na combinação do benzonidazol com o cetoconazol em camundongos infectados com as cepas CL e Y do *T. cruzi*. Em outro estudo, Urbina e *et al* (1993), demonstraram em modelo murino da doença de Chagas que a lovastatina potencializa os efeitos terapêuticos do cetoconazol eliminando os parasitos circulantes e aumentando a sobrevivência dos animais. Sendo assim, os autores sugerem a combinação da lovastatina com azólicos, como o cetoconazol, como uma alternativa para a quimioterapia.

Além disso, a literatura destaca também outros estudos nos quais a combinação de medicamentos potencializa o efeito anti-*T. cruzi*: estudos in vitro revelaram que a aspirina potencializa o efeito do nifurtimox e do benzonidazol ao aumentar a atividade antiparasitária dos macrófagos (LOPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2010); a combinação do benzonidazol com compostos heterocíclicos, como as diamidinas, foi capaz de reduzir a parasitemia em 90%, promover uma sobrevida de 100% e reduzir as lesões tissulares em 56%, nos camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, em relação aos animais tratados somente com o benzonidazol (BATISTA *et al.*, 2011) e no tratamento do benzonidazol associado com o quelante de ferro, desferrioxamina, foi observado que alterações nos níveis de ferro em combinação com o benzonidazol promoveu uma taxa de 67% de sobrevida nos animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (FRANCISCO *et al.*, 2008).

Portanto, a hipótese considerada no presente trabalho é a de que a associação do BZ com o NF ou com o cetoconazol (CETO) seria mais eficaz que o tratamento isolado com o BZ, ou seja, potencializaria o efeito anti-*T. cruzi*. Para testar essa hipótese, foram realizados três grupos experimentais, os quais foram avaliados de acordo com os parâmetros já estabelecidos por Andrade *et al.* (1985) em nosso laboratório.

De acordo com a metodologia desenvolvida, os resultados relacionados ao tratamento isolado com o BZ, NF e CETO, corroboram outros estudos existentes na literatura. Esses medicamentos, administrados precocemente e por tempo prolongado, são capazes de suprimir a parasitemia e aumentar a sobrevida de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 1985b; BRENER *et al.*, 1993; ARAUJO *et al.*, 2000).

Além disso, a diminuição das lesões fibrótico-inflamatórias, o alto percentual de cura parasitológica e a diminuição dos Títulos sorológicos confirmam dados anteriormente obtidos em outros estudos em relação ao BZ (ANDRADE *et al.*, 1985b). Entretanto, a exceção foi o grupo dos animais tratados com o NF que tiveram um baixo índice de cura (5,26%) em relação ao tratamento com o BZ e o CETO. Embora o tratamento com o NF tenha proporcionado uma negatificação precoce da parasitemia e uma sobrevida de 100% dos animais, as lesões teciduais do miocárdio e músculo esquelético estavam presentes e eram significativas. Do total de 17 casos analisados, aproximadamente 89,48% dos animais sobreviventes, detectou-se alterações inflamatórias focais e difusas no coração e presença de

áreas focais de fibrose (Figura 5 A). Além disso, o músculo esquelético apresentava lesões perivasculares com densos infiltrados mononucleares, com envolvimento de feixe vículo-nervoso intersticial, variando de discreto a intensos (Figura 5 B). Segundo Andrade *et al* (1975) o baixo índice de cura parasitológico do NF, mesmo com a negativação da parasitemia e alta taxa de sobrevivência ao longo do tratamento, poderá estar relacionado com a seleção de clones resistentes que poderiam estar determinando a positividade parasitêmica.

Deve-se levar em conta que a cepa Y (*T. cruzi* II), utilizada no presente estudo está incluída entre as que são mais suscetíveis ao tratamento com BZ e com o NF, mas os mesmos não promovem a cura em 100% dos casos. Portanto, a associação do BZ com o NF ou com o CETO, de acordo com a hipótese do presente trabalho, poderá potencializar o efeito do BZ e assim, promover a cura da infecção pelo *T. cruzi*. A escolha da cepa Y, para avaliar a eficácia do tratamento, está de acordo com Romanha *et al* (2010) que através de um Workshop realizado no Estado do Rio de Janeiro/RJ/Brasil em 2008, determinaram o “screening” para o teste de drogas para o tratamento da doença de Chagas.

Os resultados obtidos da associação do BZ com o NF ou CETO indicaram nítida semelhança em relação ao tratamento somente com o BZ. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significantes entre o tratamento com BZ e a associação dos medicamentos, é importante ressaltar a redução precoce dos níveis parasitêmicos, o baixo índice de mortalidade e a alta percentagem de cura dos animais tratados com ambas as drogas. Os dados obtidos no presente trabalho em relação aos critérios de cura utilizados, foram possíveis porque foram baseados em prévias experiências do nosso laboratório (ANDRADE *et al.*, 1976, 1977, 1985b e 1987) utilizando os dados combinados dos testes parasitológicos e os Títulos sorológicos por imunofluorescência indireta, tendo estabelecido como ponto de corte (cut off) de 1:40. Este aspecto é de interesse tendo em vista que a memória imunológica, determinada pela presença de antígenos parasitários nas células dendríticas foliculares do baço (ANDRADE *et al.*, 1988) pode manter a sorologia positiva após a cura parasitológica, antes de sofrer o “clearance”.

É de fundamental importância que outros parâmetros sejam utilizados como critérios de cura. É de interesse de nosso grupo de estudo, avaliar a eficácia da PCR (reação em cadeia da polimerase) como critério de cura da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre a utilização da PCR,

pelo fato de que a presença de fragmentos de DNA do parasito morto poderá indicar resultado positivo. Estudos importantes (*), com portadores da doença de Chagas na Bolívia, estão sendo realizados pelos Médicos sem Fronteiras e pela DNDi, com o objetivo de otimizar e validar a técnica da PCR.

O presente estudo confirma a eficácia no tratamento da infecção experimental pelo *T. cruzi* com o BZ, sendo que no grupo tratado com o BZ em combinação com o NF, o tratamento com o BZ isoladamente determinou o índice de cura de 80% e a combinação com o NF (índice de cura de 100%) não havendo diferença significativa. No grupo tratado com o BZ em combinação com o CETO, o tratamento isoladamente com o BZ determinou 80% de cura e a combinação com o CETO determinou o índices de cura de 100%, mas também sem diferença significativa. Utilizando uma metodologia semelhante, Araújo *et al* (2000) também observou cura em 100% dos animais tratados com 100 mg/kg/dia de BZ em combinação com 120 mg/kg/dia de CETO. Entretanto, a análise histopatológica desenvolvida no presente trabalho, revelou que o tratamento combinado de BZ + CETO não determinou diminuição significativa das lesões necrotico-inflamatórias do miocárdio. Em 9/13 casos apresentaram infiltrados inflamatórios focais ou difusos e com discreta fibrose intersticial no miocárdio (Figuras 8 E e 8 F).

Aparentemente a falta de significância estatística deveu-se ao emprego de dosagens padronizadas em estudos prévios, abordando particularmente monoterapia. Presumivelmente nesta abordagem de terapia combinada, será mais esclarecedor o uso de dosagens inferiores, permitindo a evidenciação de eventuais interações aditivas e/ou sinérgicas. Assim sendo, novos experimentos se fazem necessários para elucidar a efetividades das combinações supracitadas.

(*) INFORMATIVO n.2- Plataforma de Pesquisa Clínica em doença de Chagas, Rio de Janeiro/RJ/Brasil, Novembro de 2012.

13. CONCLUSÃO

- 1) Os resultados do tratamento isolado com o BZ mostraram eficácia em relação ao índice de cura e a nítida diminuição das lesões no miocárdio e no músculo esquelético;
- 2) O tratamento combinado do BZ com o NF não determinou aumento significativo, em relação ao índice de cura, e nem diminuição significativa das lesões no miocárdio e músculo esquelético, quando comparado com os animais tratados somente com BZ;
- 3) A associação do BZ com o CETO também não demonstrou um efeito significativo, em relação aos testes de cura e ao estudo histopatológico, em comparação ao subgrupo BZ;
- 4) Não houve diferença significativa da associação do BZ com o NF ou com o CETO, em relação ao tratamento isolado com o BZ.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, X. Evaluación del allopurinol en la enfermedad de Chagas crónica humana em Chile. **Parasitología**, v. 11, p. 132-134, 1987.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 39-46, 1985a.
- ANDRADE, Z. Patologia da Doença de Chagas. In: ANDRADE, ZA; BRENER, Z; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 379-388.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. Aspectos anatomopatológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, p. 268-275, 1976.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. Doença de Chagas. In: SCHECHTER, M e MARANGONI, DV. **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 221-226.
- ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; STEINDEL, M.; GUERREIRO, M. L.; MAGALHAES, J. B.; ALMEIDA, M. C.; REIS, J. N.; SANTOS, V. C.; VALADARES, H. V. S.; GALVÃO, M.; MACEDO, A. M. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 948-56, 2011.
- ANDRADE, S. G.; CASTRO, S. R.; SANTIAGO, C. M. G.; FREITAS, L. A. R. Therapeutic action of the MK-436 (2-5 Nitroimidazol) in *Trypanosoma cruzi* infection in mice: a parasitological, serological, histopathological and ultrastructural study. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 65, p. 625-633, 1987.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M. Experimental study on the therapeutic action of Ro 7-1051 on infections caused by different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 19, n. 5, p. 335-341, 1977.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benzonidazole and nifurtimox in mice infected with *T. cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 721-726, 1985b.

ANDRADE, S. G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A. S.; GRIMAUD, J. A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 187-200, 1991.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G. Tratamiento de la enfermedad de Chagas humana crónica con Itraconazol y Alopurinol. Informe Preliminar. **Revista Médica de Chile**, v. 122, p. 420-7, 1994.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 243-253, 2010.

APT, W. B.; ZULANTAY, I. A. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Revista Médica de Chile**, v. 139, p. 247-257, 2011.

ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, A. O.; PEREIRA, M. E. S.; BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 819-824, 2000.

AVILA, J. L.; AVILA, A. *Trypanosoma cruzi*: alopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. **Experimental Parasitology**, v. 51, p. 204-208, 1981.

BACCHI, C. J.; YARLETT, N. Polyamine metabolism. **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites**, p. 119-131, 1995.

BATISTA, D. G. J.; BATISTA, M. M.; OLIVEIRA, G. M.; BRITTO, C. C.; RODRIGUES, A. C. M.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. Combined Treatment of Heterocyclic Analogues and Benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* In Vivo. **Plos One**, v. 6 (7), p. e22155, 2011.

BERNARDES, L. S.C.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7075-7082, 2006.

BOCK, M.; GONERT, R.; HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. **Boletín chileno de parasitología**, v. 24, p. 13-19, 1969.

BOCK, M.; HABERKORN, A.; HERLINGER, H.; MAYER, K. H.; PETERSEN, S. The Structure-Activity Relationship of 4-(5'-Nitrofurfurylidene-amino)-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxides Active against *Trypanosoma cruzi*. **Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)**, v. 22, n. 9a, 1972.

BRASIL. Vigilância em saúde: zoonoses. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**, 2009.

BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, p. 43-49, 1961.

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

BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. **Advances in Pharmacology & Chemotherapy**, v. 13, p. 1-44, 1975.

BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: ANDRADE, ZA; BRENER, Z; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 379-388.

CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO LIMA C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of chagas' disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 44, p. 97-103, 2002.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, p. 227-235, 1966.

CANÇADO, J.R.; MARRA, U. D.; BRENER, Z. Clinical Therapeutic Trial of 5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone (nitrofurazone) in the chronic form Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 12-6, 1964.

CANÇADO, J. R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: ANDRADE, ZA; BRENER, Z; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 389-405.

CASTRO, S.L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: Na update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 53, p. 83-98, 1993.

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

COURA, JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104(4): 549-554, 2009.

CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, P. C.; BARBOSA, L. G.; MADY, C.; IANNI, B.; STOLF, N.; FIORELLI, A.; HONORATO, R.; KALIL, J. New concepts in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 59-62, 2006.

DE SOUZA, W. O Parasito e sua interação com os hospedeiros. In: ANDRADE, Z. A; BARRAL NETTO, M; BRENER, Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-119.

De SOUZA, M. V. N.; KAISER, C. R.; CUNICO, W.; PINHEIRO, A. C.; OLIVEIRA, A. G.; PERALTA, M. A. Oxazolidinonas: uma nova classe de compostos no combate à tuberculose. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88(2), p. 83-88, 2007.

DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 15; 44 (10) p. 880-1, 1988.

DIAS, JCP. Doença de Chagas, Clínica e Terapêutica. **Ministério da Saúde, Sucam**, Brasília, 56 p. 1990.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral. **Cadernos de Saúde Pública (FIOCRUZ)**, Rio de Janeiro, p. 486, 1997.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: ANDRADE, Z. A; BARRAL NETTO, M; BRENER, Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-119.

DIAS, J. C. P.; VINHAES, M. C. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 7-12, 2000.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 357-592.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 2020-2021, 2006.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública (FIOCRUZ)**, Rio de Janeiro, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DOCAMPO, R.; STOPPANI, A. O. M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 197, p. 317-321, 1979.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American Trypanosomiasis (Chagas disease). **Rev Biochem Toxicol**, v. 7, p. 159-204, 1985.

DVORAK, J. A. Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: how an why? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 28-38, 1985.

FAIRLAMB, A.H. Trypanotone metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89 (Suppl. I), P. 37, 1994.

FRANCISCO, A. F.; DE ABREU VIEIRA, P.; ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. C.; MARTINS, H. R.; SILVA, M.; VELOSO, V. M.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi*: Effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 314-319, 2008.

GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 1331-1336, 1985.

GONZALES-PERDOMO, M. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation is blocked by topoisomerase II inhibitors. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 34, p. 1707-1714, 1990.

HIGASHI, K. O.; CASTRO, S. L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have no impact on its interaction with host cells. **Journal Ethnopharmacol**, v. 43, p. 149-155, 1994.

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEE-LIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J. A. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 167-171, 2010.

MALDONATO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, USA, v. 37, n. 6, p. 1353-1359, 1993.

MASSARO, D. C.; REZENDE, D. S.; CAMARGO, L. M. A. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, p. 228-40, 2008.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, 999-1006, 2003.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 601-2, 2007.

McCABE, R. E.; ARAUJO, F.G.; REMINGTON, J. S. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. **AM J Trop Med Hyg**, v. 32 (5), p. 960-962, 1983.

MENEZES, D.; VALENTIM, C.; OLIVEIRA, M. F.; VANNIER-SANTOS, M. A. Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 98, n. 2, p. 99-105, 2006.

MILES, M. A.; CIBULSKIS, R. E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, v. 2, p. 94-101, 1986.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Endocrinology**, v. 107, p. 367-371, 1994.

MOREIRA, A. A. B.; SOUZA, H. B. W.T.; AMATO-NETO, V.; MATSUBARA, L.; PINTO, P. L. S.; TOLEZANO, J. E.; NUNES, E. V.; OKUMURA, M. Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34 (2), p. 177-180, 1992.

NERY-GÜIMARÃES, F.; SILVA, N. N; CALUSELL, D. T.; MELLO, A. L.; RAPPONE T.; SNELL, T.; RODRIGUES, N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). **Hospital**, v. 73, p. 1767-1804, 1968.

OLIVEIRA, W. J. R. Atenção Integral ao Paciente Chagásico. Uma proposta para o cuidar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 1, 2005.

OMS. Organización mundial de la salud. Uso de medicamentos esenciales: lista modelo de medicamentos esenciales (séptima lista). **Série de Informes Técnicos 825**, Ginebra, 1992.

OMS. Treatment Guideline of adults and adolescents in resource-limited settings. **Revision of WHO ARV**, Suíça, 2005.

PIZZI, T. Sobre el problema de las formas delgadas de "*Trypanosoma cruzi*" (comunicacion preliminar). **Boletín Inf. Parasitol Chilenas**, v. 8, p. 26-30, 1953.

PRAGER, R. Estabilization de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasage seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis quantitativo del curso de la infeccion. **Biológica**, v. 16-17, p. 3-12, 1952.

POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of 2-nitromidazole derivative benznidazole. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 72, p. 228-232, 1978.

RASSI, J. A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-91, 2012.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, J. Forma Digestiva da Doença de Chagas. In: ANDRADE, ZA; BRENER, Z; BARRAL NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 201-230.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma Indeterminada da Doença de Chagas. In: ANDRADE, ZA; BRENER, Z; BARRAL NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 246-248.

RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of RO-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **Le Progres Medical**, v. 101, p. 282, 1973.

ROMANHA, A. L. Heteropatogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. [S.I.]: **Universidade Federal de Minas Gerais**, 1982.

ROMANHA, A. J.; OLIVEIRA, R. B.; ZANI, C. L.; FERREIRA, R. S.; LEITE, R. S.; ALVES, T. M.; SILVA, T. H. Síntese, avaliação biológica e modelagem de Arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona redutase. **Química Nova**, v. 31, p. 261-267, 2008.

ROMANHA, A.J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B. P.; Zani, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, E.; Calzada, J. E.; BUSTAMANTE, J.; FREITAS-JUNIOR, H.; ROMERO, L.; BAHIA, M.; LOTROWSKA, M.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. In vitro and in vivo experimental models to drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso)*, v. 105, p. 233-238, 2010.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.; BRENER, Z. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.p. 1-15.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JUNIOR, E. R.; LOPES, M. H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 351-357,1991.

STEINDEL, M.; PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M. H.; EGER,I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P.H.; MURTA, S. M.F.; CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina state, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25-32, 2008.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **Parasitology International**, v. 28, p. 85-104, 1998.

URBINA, J.A.; MALDONADO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARÉS, G. Experimental Chemotherapy with combinations of Ergosterol Biosynthesis in Murine Models of Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, June, p. 1353-1359, 1993.

URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Dis**, v. 9, p.287-295, 2002.

URBINA, J.A.; FERRAZ, M.L.; GAZZIELLI, R.T.; ALVES, R.O.; ROMANHA, A.J. The Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease Is Less Dependent on Gamma Interferon than That of Benznidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Apr, p. 1359–1364, 2007.

WARREN, L. G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 529-39, 1960.

WHO. **Control of Chagas' disease**. Geneva: **Technical Report Series**, v. 905, 2002.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **[S.I.]: Fact sheet**, v. 340, 2010.

WHO. World Health Organization. Control of Chagas' disease. **WHO Tech. Rep. Ser.** No. 811, 1991.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature□: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.