

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**VALQUIRIA ANGELIS FERNANDES**

**ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL APLICADOS À QUIMIOTERAPIA  
DA DOENÇA DE CHAGAS**

**ALFENAS/MG**

**2025**

**VALQUIRIA ANGELIS FERNANDES**

**ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL APLICADOS À QUIMIOTERAPIA  
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Microbiologia e Parasitologia aplicadas às Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda Latércia Tranches Dias

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lívia de Figueiredo Diniz Castro

**ALFENAS/MG**

**2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Fernandes, Valquíria Ângelis.

Estudos de biodistribuição tecidual aplicados à quimioterapia da doença de Chagas / Valquíria Ângelis Fernandes. - Alfenas, MG, 2025.  
96 f. : il. -

Orientador(a): Amanda Latércia Tranches Dias.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Trypanosoma cruzi. 2. PCR. 3. Biodistribuição tecidual. I. Dias, Amanda Latércia Tranches, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

**VALQUÍRIA ÂNGELIS FERNANDES**

**"ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL APLICADOS À QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS"**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 29 de agosto de 2025.

Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz Castro  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes  
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. Fabiane Matos dos Santos  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Angélica Rosa Faria  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Livia de Figueiredo Diniz Castro, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2025, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)

---

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL.

Agradeço minhas orientadoras Amanda e Livia pela paciência, cuidado, respeito e profissionalismo. Foi uma ótima experiência em minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, amigos e em especial minha família que me apoia há 30 anos sem mesmo compreender tudo o que faço, isso é amor! Muito obrigada.

Meu respeito por todos os animais que foram utilizados neste trabalho.

Por fim agradeço a Deus e todas às entidades que me guiam, protegem e fortalecem minha fé num mundo melhor.

## RESUMO

Os mecanismos que explicam a resistência de *Trypanosoma cruzi* ao tratamento etiológico ainda não são claros. O objetivo deste projeto foi investigar se a distribuição tecidual do parasito e a resposta imune do hospedeiro influenciam na resposta de diferentes cepas de *T. cruzi* ao tratamento etiológico. Para isso foram usados o benznidazol (100mg/kg), um fármaco nitro-heterocíclico, e o E1224 (50mg/kg), um azol inibidor da biossíntese de ergosterol com reconhecida atividade tripanossomicida. Camundongos BALB/c infectados pelas cepas Colombiana e CL Brener (resistente e susceptível ao benznidazol, respectivamente) foram tratados por 5 dias consecutivos na fase aguda da infecção. A parasitemia foi avaliada diariamente e o perfil de distribuição tecidual investigado, por qPCR, em dois momentos distintos: no último dia de tratamento e 5 dias após o término do tratamento. A quantificação de citocinas Th1/Th2/Th17 foi realizada em amostras de plasma obtidas no último dia de tratamento. Grupos controle infectados ou não foram incluídos. Os resultados indicaram que o coração, músculo esquelético e tecido adiposo foram os nichos de maior carga parasitária nos animais infectados pela cepa Colombiana na fase aguda. Para a cepa CL foi identificada alta carga parasitária em todos os órgãos, particularmente pulmão, rim, músculo esquelético e intestino grosso. O benznidazol e o E1224 reduziram significativamente o parasitismo em todos os órgãos dos animais infectados pela cepa Colombiana; o mesmo foi observado para o benznidazol no tratamento da infecção pela cepa CL. Contudo, diferentes perfis foram observados após imunossupressão. Para a cepa CL, não foi detectado aumento da carga parasitária pós-imunossupressão; pelo contrário, no tecido adiposo, baço e fígado, o número de parasitos foi significativamente menor. Para a cepa Colombiana, foi identificada reativação após tratamento com benznidazol no coração, tecido adiposo e intestino grosso, enquanto coração e fígado foram os sítios de recrudescência após tratamento com E1224. A infecção aguda induziu perfil similar, pró-inflamatório, de citocinas para ambas as cepas. A redução da carga parasitária, independente do fármaco ou cepa, modulou negativamente as citocinas do perfil Th1, cujos níveis foram significativamente menores do que os observados para os animais infectados e não tratados. Nossos dados evidenciam que o perfil de citocinas identificado não se apresentou como fator determinante na resposta de susceptibilidade ou resistência ao benznidazol na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Ainda, indicam que a cepa Colombiana, resistente à terapia com benznidazol e E1224, possui coração, músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e/ou intestino grosso como reservatórios de *T. cruzi* após tratamento etiológico com esses fármacos, podendo contribuir para falha terapêutica.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; PCR; Biodistribuição tecidual

## ABSTRACT

The mechanisms that explain *Trypanosoma cruzi* resistance to etiological treatment are still unclear. The objective of this project was to investigate whether the parasite's tissue distribution and the host immune response influence the response of different *T. cruzi* strains to etiological treatment. Benznidazole (100 mg/kg), a nitroheterocyclic drug, and E1224 (50 mg/kg), an azole ergosterol biosynthesis inhibitor with recognized trypanocidal activity, were used. BALB/c mice infected with the Colombiana and CL Brener strains (benznidazole-resistant and -susceptible, respectively) were treated for 5 consecutive days during the acute phase of infection. Parasitemia was assessed daily, and the tissue distribution profile was investigated by qPCR at two different time points: on the last day of treatment and 5 days after the end of treatment. Th1/Th2/Th17 cytokine quantification was performed on plasma samples obtained on the last day of treatment. Infected or uninfected control groups were included. The results indicated that the heart, skeletal muscle, and adipose tissue were the niches with the highest parasite burden in animals infected with the Colombian strain in the acute phase. For the CL strain, a high parasite burden was identified in all organs, particularly the lung, kidney, skeletal muscle, and large intestine. Benznidazole and E1224 significantly reduced parasitism in all organs of animals infected with the Colombian strain; the same was observed for benznidazole in the treatment of CL strain infection. However, different profiles were observed after immunosuppression. For the CL strain, no increase in parasite burden was detected post-immunosuppression; on the contrary, the number of parasites was significantly lower in adipose tissue, spleen, and liver. For the Colombian strain, reactivation was identified after treatment with benznidazole in the heart, adipose tissue, and large intestine, while the heart and liver were the sites of recrudescence after treatment with E1224. Acute infection induced a similar, pro-inflammatory cytokine profile for both strains. Reduction in parasite load, regardless of the drug or strain, negatively modulated Th1 cytokines, whose levels were significantly lower than those observed in infected, untreated animals. Our data demonstrates that the identified cytokine profile was not a determining factor in the susceptibility or resistance response to benznidazole in the acute phase of *T. cruzi* infection. Furthermore, they indicate that the Colombian strain, resistant to therapy with benznidazole and E1224, has the heart, skeletal muscle, liver, adipose tissue, and/or large intestine as reservoirs of *T. cruzi* after etiological treatment with these drugs, which may contribute to treatment failure.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; PCR; Tissue biodistribution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química do fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas, o benznidazol.....	17
Figura 2-	Mecanismo de ação tripanossomicida do benznidazol frente a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	18
Figura 3-	Fluxograma dos grupos experimentais utilizando cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> .....	31
Figura 4-	Fluxograma dos grupos experimentais utilizando cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> .....	31
Figura 5-	Supressão da parasitemia pelo benznidazol e E1224 em camundongos infectados pela cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> .....	36
Figura 6-	Distribuição tecidual da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c na fase aguda da infecção.....	37
Figura 7-	Distribuição tecidual da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c na fase crônica da infecção.....	38
Figura 8-	Biodistribuição da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> , aos 16 e 20 dias pós-infecção.....	39
Figura 9-	Efeito do tratamento com benznidazol e E1224 na redução do parasitismo tecidual de camundongos BALB/c infectados com cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> após a imunossupressão.....	41
Figura 10-	Impacto do tratamento com benznidazol e E1224 na supressão e recrudescência do parasitismo tecidual de camundongos BALB/c infectados com cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> .....	43
Figura 11-	Perfil dos níveis de citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-6 em camundongos BALB/c sem tratamento etiológico durante fase aguda e fase crônica da infecção com cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	45
Figura 12-	Impacto dos tratamentos com BZ e E1224 nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de camundongos infectados experimentalmente com Cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 13-	Parasitemia da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> em camundongos	

	BALB/c na ausência ou presença do tratamento com benznidazol 100mg/Kg.....	48
Figura 14-	Distribuição da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> em camundongos infectados por cepa CL Brener.....	49
Figura 15-	Impacto do benznidazol no parasitismo tecidual de animais infectados pela cepa CL Brener na presença e ausência de imunossupressão.....	51
Figura 16-	Carga parasitária quantificada em baço e fígado de camundongos infectados com a cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com benznidazol.....	52
Figura 17-	Perfil dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 em camundongos BALB/c controles não tratados, na ausência e na presença de infecção com a cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	53
Figura 18-	Impacto do tratamento com Benznidazol sob a quantificação dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ em camundongos infectados experimentalmente com cepa CL Brener de <i>T.cruzi</i> .....	54
Figura 19-	Impacto do tratamento com Benznidazol sob a quantificação dos níveis de citocinas IL-10 e IL-6 em camundongos infectados experimentalmente com cepa CL Brener de <i>T.cruzi</i> após o tratamento.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Comparação de biodistribuição das cepas Colombiana e CL Brener de <i>T. cruzi</i> em fase aguda, em camundongos BALB/c aos 20 e 25 dias de infecção, respectivamente.....	56
Tabela 2-	Impacto do tratamento etiológico com benznidazol e E1224 na biodistribuição da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c.....	57
Tabela 3-	Impacto do tratamento etiológico com benznidazol na biodistribuição da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c.....	58
Tabela 4-	Impacto da infecção e do tratamento etiológico no perfil de citocinas da fase aguda da infecção de camundongos BALB/c pelas cepas Colombiana e CL Brener de <i>T. cruzi</i> .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
BZ	Benznidazol
RV	Ravuconazol
DC	Doença de Chagas
DTUs	Discret type units
Cy	Ciclofosfamida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Par/eq	parasito- equivalente
pg/ML	picograma por mililitros
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
WAT	Tecido adiposo branco
BAT	Tecido adiposo marrom
IMAT	Tecido adiposo intermuscular
BMAT	Tecido adiposo da medula óssea
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-17a	Interleucina 17
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
IFN- $\gamma$	Interferon gama

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>13</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> E DOENÇA DE CHAGAS.....	14
2.2	TRATAMENTO ETIOLÓGICO.....	16
2.3	CANDIDATOS JÁ AVALIADOS EM ESTUDOS CLÍNICOS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	20
2.4	BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA...	22
2.5	RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	PARASITOS.....	29
3.2	FÁRMACOS E REAGENTES.....	29
3.3	ANIMAIS.....	30
3.3.1	<b>Grupos experimentais.....</b>	<b>30</b>
3.4	INFECÇÃO EXPERIMENTAL, AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA E IMUNOSSUPRESSÃO.....	32
3.4.1	<b>Coleta e armazenamento de amostras.....</b>	<b>32</b>
3.5	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	33
3.5.1	<b>Padronização de estratégia de quantificação de DNA pelo método do Ct comparativo.....</b>	<b>33</b>
3.6	PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA.....	33
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM PLASMA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	34
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
4.1	CEPA COLOMBIANA.....	36
4.1.1	<b>Impacto dos fármacos na parasitemia durante e após o tratamento.....</b>	<b>36</b>

4.1.2	Carga parasitária tecidual da cepa Colombiana por qPCR.....	37
4.1.3	Influência dos tratamentos na carga parasitária detectada por qPCR .....	40
4.1.4	Quantificação de citocinas no plasma de animais infectados com a cepa Colombiana.....	44
4.1.5	Influência do tratamento nos níveis de citocinas em animais infectados com a cepa Colombiana.....	46
4.2	CEPA CL Brener.....	47
4.2.1	Impacto do fármaco na parasitemia durante e após o tratamento com benznidazol.....	47
4.2.2	Carga parasitária tecidual da cepa CL Brener por qPCR.....	49
4.2.3	Influência do tratamento com benznidazol na carga parasitária de animais infectados pela cepa CL Brener.....	50
4.2.4	Quantificação dos níveis de citocina em cepa CL Brener.....	53
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXO A .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

Considerada uma doença tropical negligenciada, a doença de Chagas (DC) é endêmica na América Latina (WHO, 2025). Embora muitos avanços tenham sido alcançados no controle da transmissão vetorial e transfusional da infecção em diversas regiões e o número de casos tenha sido drasticamente reduzido (Coura, 2007), ainda não há tratamento eficaz e seguro para a fase crônica da doença.

O benznidazol (LAFEPE) (BZ) é o fármaco de primeira escolha. Utilizado há décadas, seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido. Sabe-se que sua metabolização resulta na conversão a um metabólito altamente reativo que se liga a macromoléculas e a glutatona interferindo na síntese de DNA, RNA e proteínas importantes para o parasito, além de deixá-lo mais susceptível ao stress oxidativo (Galván *et al.*, 2020; Hall e Wilkinson, 2012). Contudo, esses mecanismos podem ser citotóxicos também para o hospedeiro, levando a reações adversas que motivam a descontinuação do tratamento em até 32% dos pacientes (Morillo *et al.* 2017). Ainda, existe uma relação inversa entre eficácia e fase da infecção na qual o tratamento é administrado; índices de cura de até 100% são observados no tratamento da infecção congênita e fase aguda (Molina e Molina, 2018), enquanto na fase crônica os índices de falha terapêutica ficam em torno de 80% (Morillo *et al.*, 2017).

Diante das limitações apresentadas, muitos estudos têm sido feitos, principalmente nas duas últimas décadas, com o objetivo de encontrar tratamentos mais eficazes e bem tolerados. Esses estudos incluem a busca de novas moléculas tripanossomicidas; novas formulações para os fármacos de referência; reposicionamento e combinação de medicamentos, dentre outras (Kratz *et al.*, 2018). Esses esforços culminaram na avaliação clínica (fase II- prova de conceito no tratamento da fase crônica assintomática) dos candidatos mais promissores identificados nas avaliações pré-clínicas, os derivados azólicos posaconazol e ravuconazol (na forma de pró-fármaco E1224) e o nitroimidazol fexinidazol (Pinazo *et al.*, 2024). Reposicionadas da terapia antifúngica, essas moléculas atuam inibindo a enzima esterol C-14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), envolvida na biossíntese de ergosterol de fungos e *T. cruzi* (Urbina *et al.*, 2003). Ambos os fármacos apresentaram perfis satisfatórios de tolerância e toxicidade e foram efetivos em suprimir o parasitismo durante o tratamento, mas o *follow-up* até 12 meses pós-tratamento detectou falha

terapêutica em cerca de 90% dos casos (Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2017; Torrico *et al.*, 2018; Torrico *et al.*, 2023). Já o fexinidazol, apesar de resultados muito promissores, necessitou de altas doses, tóxicas, para ter eficácia terapêutica, o que inviabilizou o seu uso clínico (Pinazo *et al.*, 2024).

As razões para os altos índices de falha terapêutica resultantes do tratamento na fase crônica com compostos nitroheterocíclicos e azólicos ainda não são conhecidas. Filardi e Brener (1987), utilizando modelo murino de infecção aguda descreveram a existência de cepas de *T. cruzi* que são “naturalmente susceptíveis ou naturalmente resistentes” ao BZ e ao nifurtimox *in vivo*. Em geral, para as cepas resistentes, os fármacos eram eficazes em interferir na parasitemia, mas após cessar o tratamento o parasitismo era progressivamente aumentado. Tradicionalmente, esse caráter de resistência tem sido relacionado à ampla variedade genética e fenotípica do parasito (Zingales *et al.*, 2012); as cepas de *T. cruzi* são classificadas em sete linhagens ou *DTUs* (*discret type units*), de acordo com as características morfológicas e moleculares (Zingales *et al.* 2012; Zingales *et al.*, 2018).

Após a falha terapêutica dos azólicos avaliados em estudos clínicos, o tema tem sido mais amplamente discutido e evidências têm apontado que o caráter de “resistência” é relativo e não absolutamente dependente da genética do parasito (Sanchez-Valdez *et al.*, 2018). Fatores como susceptibilidade *in vitro* aos fármacos para os quais as cepas são resistentes *in vivo* (Moraes *et al.*, 2014), maiores índices de cura com tratamento precoce da infecção (Diniz *et al.*, 2018) ou com doses intermitentes e por períodos prolongados (Bustamante *et al.*, 2014; Mazzeti *et al.*, 2018), tanto para nitroheterocíclicos quanto para azólicos, além da descrição de formas intracelulares dormentes (Sanchez-Valdez *et al.*, 2018) e tropismo tecidual distinto entre as cepas (Andrade, 1990; Francisco *et al.*, 2017) endossam a hipótese que a falha terapêutica pode estar relacionada ao acesso limitado dos fármacos aos tecidos nos quais o parasito se encontra (Diniz *et al.*, 2018; Galván *et al.*, 2020; Sanchez-Valdez *et al.*, 2018;; Urbina *et al.*, 2003). Nesse sentido, conhecer de forma aprofundada a distribuição tecidual do parasito e o impacto dos agentes tripanossomicidas pode auxiliar não só na compreensão dos mecanismos de resistência de *T. cruzi* ao tratamento etiológico, como também na melhoria do valor translacional dos modelos de avaliação pré-clínica e na proposição racional de alvos e regimes terapêuticos mais adequados (Galván *et al.*, 2020).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre a distribuição tecidual de *T. cruzi* e a resposta imune do hospedeiro no perfil de resistência de diferentes cepas de *T. cruzi* ao tratamento etiológico.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar e quantificar, na fase aguda da infecção murina, a distribuição tecidual das cepas Colombiana e CL Brener de *T. cruzi*;
- b) avaliar o impacto do tratamento com benznidazol na distribuição e intensidade do parasitismo tecidual comparativamente entre animais infectados pelas cepas susceptível (CL Brener) e resistente (Colombiana) ao tratamento etiológico;
- c) avaliar o impacto do tratamento com E1224 no parasitismo tecidual resultante da infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*;
- d) investigar a relação entre alteração da carga parasitária tecidual pós-imunossupressão e o perfil de susceptibilidade/resistência das cepas CL Brener e Colombiana de *T. cruzi* ao tratamento etiológico;
- e) verificar se o perfil de citocinas em camundongos infectados por *T. cruzi* pode estar relacionado à resposta de diferentes cepas ao tratamento etiológico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS

A morfologia e biologia do protozoário *T. cruzi*, assim como os vetores e aspectos epidemiológicos da doença de Chagas, foram descritos pelo médico e pesquisador Carlos Chagas ainda em 1909 (Chagas, 1909). As formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas estão presentes no vetor, enquanto as amastigotas, intracelulares, e tripomastigotas sanguíneas, extracelulares, estão presentes nos hospedeiros vertebrados. O parasito apresenta predomínio de propagação clonal com eventuais recombinações genéticas, e é caracterizado por uma extensa heterogeneidade (Zingales, 2012; Zingales *et al.*, 2018).

O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, capaz de invadir, se multiplicar e estabelecer a infecção em qualquer tipo celular nucleado (Duran-Rehbein *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2019). A capacidade invasiva e multiplicativa do parasito pode variar ou ser regulada de acordo com a célula hospedeira, assim como o metabolismo celular (Andrade *et al.*, 1999; Caradonna *et al.*, 2013).

A transmissão vetorial ainda é a principal forma de infecção na América Latina (Alejandra *et al.*, 2024; Coura e Junqueira, 2015). Os vetores são insetos hematófagos reduvídeos pertencentes à subfamília Triatominae, sendo os principais gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Silva, 2006), nos quais se incluem espécies altamente adaptadas ao peridomicílio ou domicílio comumente conhecidas como “barbeiros”. No Brasil, a exemplo de outros países que tiveram sucesso nas iniciativas de controle, a principal espécie de vetora domiciliar (*Triatoma infestans*), está controlada. Contudo, a interrupção completa da transmissão vetorial é considerada praticamente impossível, devido à complexidade ecológica do parasita, diversidade de vetores e fatores socioambientais (Arias *et al.*, 2022). Após o controle de espécies principais, espécies nativas e secundárias têm ocupado nichos domésticos, dificultando o controle sustentado (Cantillo-Barraza *et al.*, 2025; Lima-Neva *et al.*, 2021). Ainda, a resistência a inseticidas em populações de vetores e a necessidade de vigilância contínua desafiam a sustentabilidade dos programas de controle (Alejandra *et al.*, 2023; Gürtler, Fernández e Cardinal, 2021;).

Nesse cenário, outras vias de infecção têm assumido grande relevância epidemiológica, como a via oral, cuja transmissão do parasito se dá por meio da

ingestão de polpas de frutos contaminados, como o açaí (Dias *et al.*, 2016; Noya e González, 2015; Santos *et al.*, 2017). A transmissão pode se dar ainda por transfusão de sangue, por via congênita, transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, dentre outros (Coura, 2007). Com o controle das vias vetoriais e transfusionais em muitos países, a transmissão vertical tornou-se a principal fonte de novos casos em diversas regiões, inclusive em áreas não endêmicas devido à migração (Abras *et al.*, 2022; Gürtler, Segura e Cohen, 2003;). Assim, a transmissão congênita é um desafio para o controle da DC, que exige diagnóstico precoce, rastreamento das gestantes e tratamentos para redução de novos casos (Abras *et al.*, 2022; Bern *et al.*, 2009).

A infecção se apresenta em duas fases distintas, sequenciais e, geralmente, assintomáticas. A fase aguda compreende as primeiras semanas após o estabelecimento da infecção e é caracterizada pela intensa multiplicação do parasito e presença de tripomastigotas na corrente sanguínea. Essa fase é acompanhada por intensa resposta imunológica que atua no controle do parasitismo, mas não leva à eliminação da infecção. Os pacientes podem apresentar sintomas leves, embora em alguns casos haja manifestações graves como miocardite ou meningoencefalite (Coura, 2007; Kratz *et al.*, 2018).

Na evolução natural da doença, ou ainda na ausência de eficácia terapêutica na fase aguda, a infecção se torna crônica (Coura *et al.* 2002), e a resposta imune está relacionada tanto com o controle da infecção quanto com as manifestações clínicas cardíacas e digestivas futuras da doença, responsáveis pela morbimortalidade dos pacientes (Bonney *et al.*, 2019; Coura, 2007; Kratz *et al.* 2018). Nesta fase os parasitos são encontrados predominantemente na forma intracelular replicativa, particularmente no coração e trato digestório (Bonney *et al.*, 2019). Estudos feitos na América Latina indicam que 60-70% dos indivíduos infectados são assintomáticos, enquanto as cardiomiopatias severas e lesões digestivas somam 30-40% casos, geralmente aparecendo décadas após a infecção inicial (Kratz *et al.*, 2018; Zingales, 2011).

A doença de Chagas é uma parasitose que afeta principalmente populações de áreas em vulnerabilidade socioeconômica, sendo considerada uma doença tropical crônica negligenciada, endêmica na América Latina (WHO, 2025). Estima-se que 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo protozoário, enquanto 75 milhões de pessoas estão expostas à infecção (WHO, 2025). Apesar disso, a doença de Chagas tem sido detectada no Estados Unidos, Canadá, países europeus,

africanos, mediterrâneos orientais e do Pacífico ocidental (WHO, 2025), devido à migração de pessoas de área endêmicas (Andrade *et al.*, 2024; Gascon, Bern, Pinazo, 2010).

## 2.2 TRATAMENTO ETIOLÓGICO

Descobertos ao final da década de 1960, os compostos nitroheterocíclicos benznidazol (LAFEPE) e nifurtimox (Lampit®, Bayer) (NFX) ainda são os únicos fármacos recomendados para o tratamento da fase aguda e crônica da doença (Torrico *et al.*, 2021; Kratz *et al.*, 2018). No Brasil o NFX não é utilizado, pois apresenta menor tolerabilidade quando comparado com o BZ (Dias *et al.*, 2016).

Nos anos seguintes a 1960, devido a evidências de que a resposta imune era responsável pelas complicações da doença, e não apenas relacionada com a presença de parasitismo, foi desaconselhado o uso do BZ em pacientes crônicos (Brenner, 1984). Já nos anos 2000, estudos mostraram a persistência do parasito como fator causador da patogênese na fase crônica (Viotti *et al.*, 2013), ou seja, além do papel da resposta imune do hospedeiro, a permanência do parasito nos tecidos tornou-se evidenciada como extremamente relevante no desenvolvimento na DC (Cruz *et al.*, 2016).

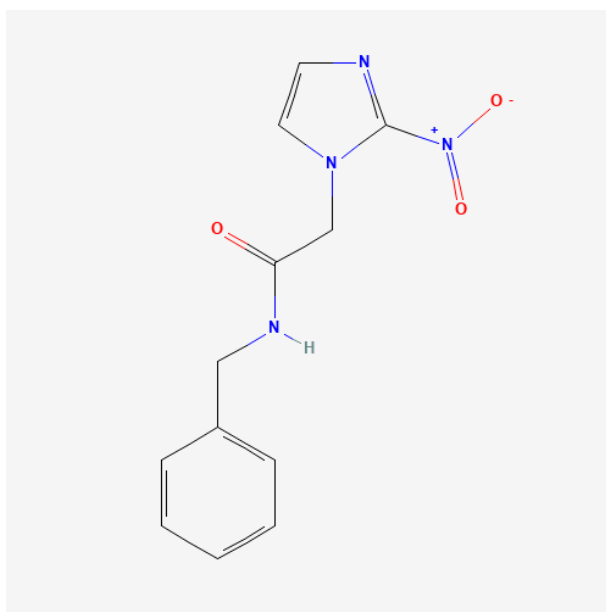
O tratamento tem efeito satisfatório na fase aguda da doença, podendo chegar a 100% de cura se administrado nesta fase (Bern, 2011; Coura; De Castro, 2002). No entanto, a principal limitação na quimioterapia da doença de Chagas é a ineficácia do tratamento da fase crônica; cerca de 80% dos pacientes aos quais os medicamentos são administrados nessa fase não são curados (Cançado, 2002; Guedes *et al.*, 2011; Morillo *et al.* 2017; Santos *et al.*, 2012). Além disso, o perfil de tolerância do BZ é insatisfatório, provocando reações adversas como dermatia alérgica, síndromes gastrointestinais e com menor frequência, depressão da medula óssea (Montilla *et al.*, 2023; Rassi *et al.* 2009). Essas reações são responsáveis pela desistência dos pacientes ao tratamento (Molina; Molina, 2018).

Em 2018, foi aprovado no Brasil o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da doença de Chagas, o qual normatizou a conduta diagnóstica e terapêutica a ser adotada no âmbito do Sistema Único de Saúde, evidenciando o BZ como fármaco de primeira escolha. De acordo com esse protocolo, recomenda-se tratar, além da infecção congênita e aguda, pacientes crônicos, com idade inferior a 50 anos,

assintomáticos ou com manifestações clínicas leves. No caso do tratamento de pacientes com cardiopatia leve a decisão é compartilhada entre médico e paciente, sendo alternativas válidas tratar com BZ ou não (PCDT, 2018). Muitos estudos de quimioterapia experimental e clínicos deram base para o desenvolvimento do atual regime de tratamento da DC. Entre as evidências que sustentam a utilização clínica do BZ como primeira escolha, destacam-se a expressiva taxa de soroconversão em crianças, o que dá ênfase ao benefício do tratamento precoce (Sosa-Estani *et al.*, 1998); a prevenção da progressão clínica da forma indeterminada para a forma cardíaca, com diminuição de eventos cardiovasculares e mortalidade em longo prazo (Cardoso *et al.*, 2018; Hasslocher-Moreno *et al.*, 2020; Kratz *et al.*, 2018).

O BZ (Figura 1) é um pró-fármaco com atividade tripanossomicida ativado enzimaticamente por nitroreduases tipo I, classe de enzimas presente em vários protozoários parasitos (Patterson e Wyllie, 2014). A posologia recomendada para o BZ é de 5 a 7 mg/kg por via oral, divididos em duas ou três doses diárias durante 60 dias para adultos, e de 5 a 10 mg/kg por via oral, divididos em duas ou três doses diárias pelo mesmo período para crianças de até 12 anos (Chaben, 2015).

Figura 1- Estrutura química do fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas, o benznidazol.



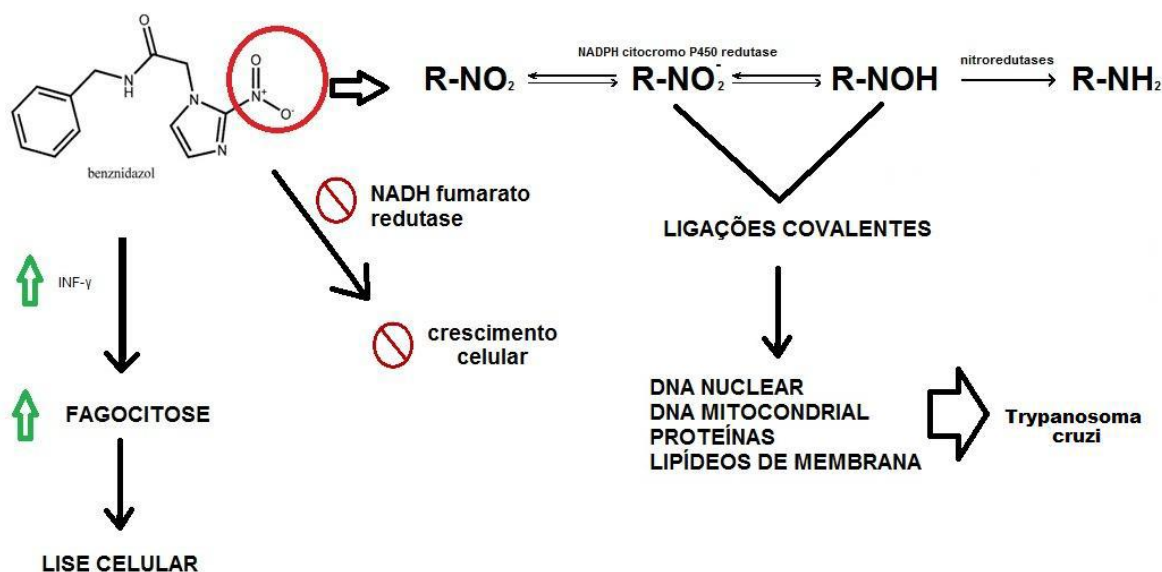
Fonte: PubChem, National Library of Medicine.

Nota: A molécula do benznidazol possui um anel imidazólico substituído na posição 2 por um grupo nitro (-NO<sub>2</sub>); um grupo acetamida ligado ao nitroimidazole e um anel benzílico ligado à acetamida.

Para alcançar o efeito tripanossomicida (Figura 2) do BZ há geração de metabólitos reativos, como radicais livres e intermediários nitro-aniônicos que causam danos ao DNA- principal mecanismo no qual quebra e inativa funções essenciais para sobrevivência-; assim como danos a proteínas e membranas do *T. cruzi*, mecanismo que levam a morte do parasito (Gálvan *et al.*, 2020; Kratz *et al.*, 2018).

O fármaco ainda pode interferir nos processos redox do parasito, aumentando o estresse oxidativo (Gálvan *et al.*, 2020; Kratz *et al.*, 2018), aumentar a expressão de IFN- $\gamma$  aumentando a fagocitose de células infectadas (Silva *et al.*, 1995; Rios *et al.*, 2019) e apresentar efeito imunomodulador, com propriedades anti-inflamatórias aumentando a expressão de IL-10 e inibindo citocinas pró-inflamatórias (Cevey *et al.*, 2019).

Figura 2- Mecanismo de ação tripanossomicida direto do benznidazol frente a infecção por *T. cruzi*.



Fonte: Davanço, 2015.

Nota: Mecanismo tripanossomicida principal se dá através de nitroreductases e produção de metabólitos reativos, que quebram ligações covalentes causando danos ao DNA; á proteínas e a lipídeos da membrana celular resultando na morte do parasito. De maneira secundária, aumenta a expressão de IFN- $\gamma$ , que estimula a fagocitose e consequentemente a lise celular.

Mesmo após mais de 50 anos de utilização, a literatura sobre farmacocinética clínica do BZ é ainda escassa (Galván *et al.*, 2020). O primeiro estudo sobre perfil farmacocinético do fármaco em humanos foi realizado em 1979 (Raaflaub e Ziegler, 1979). A seguir, após realizar um estudo com doses múltiplas em oito pacientes na

fase crônica da doença de Chagas, os autores estimaram a faixa terapêutica do BZ em 3-6 mg/L (Raaflaub, 1980). A partir de 2012, outros estudos farmacocinéticos têm sido conduzidos, em populações adultas e pediátricas, em indivíduos saudáveis e cronicamente infectados. Muito embora os resultados dos principais parâmetros farmacocinéticos serem concordantes entre esses diferentes estudos, as relações entre dose e periodicidade do tratamento, concentrações plasmáticas *versus* efeito terapêutico e incidência de reações adversas ainda são conflitantes (Galván *et al.*, 2020).

Já as avaliações de perfil farmacocinético e farmacodinâmico do BZ em modelos pré-clínicos, além de muito escassas, apresentam muitas discordâncias em termos de valores de parâmetros básicos, provavelmente pela alta diversidade de modelos experimentais – cães, coelhos, ratos e camundongos, diferentes cepas do parasito e protocolos utilizados (Perin *et al.*, 2017). De forma geral, em modelo murino, que é o mais utilizado em estudos de triagem e eficácia de novos candidatos tripanossomicidas, o fármaco é rapidamente absorvido após administração oral e apresenta meia-vida de eliminação curta, em torno de 2 horas (Perin *et al.*, 2017). Em relação à distribuição tecidual em animais saudáveis, evidências mais recentes mostram que o BZ apresenta biodistribuição limitada e altamente variável, mas conseguem atingir órgãos como, coração e cólon, que são órgãos alvo na doença de Chagas, o que poderia impactar na capacidade de eliminação do parasito devido ao curto tempo de permanência de concentrações adequadas do fármaco (Perin *et al.*, 2017; 2020). No entanto, há raríssimas evidências sobre o impacto da infecção pelo parasito na farmacocinética pré-clínica do BZ; poucos estudos foram publicados, apresentando resultados conflitantes (Francisco *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2021).

Dados de farmacocinética pré-clínica do BZ em modelo murino mostram que esse fármaco apresenta biodistribuição limitada e altamente variável (Perin *et al.*, 2020), sugerindo que as concentrações e o tempo de permanência nos diferentes tecidos podem não ser suficientes para a completa eliminação do parasito.

Diante de todos os dados relatados sobre o BZ, e a hipótese de que a falha terapêutica relacionada ao fármaco pode estar no fato de não atingir os tipos celulares parasitados, em concentrações adequadas e por tempo suficiente para eliminar o parasito, reforça a busca por novas alternativas mais eficazes para a quimioterapia da doença de Chagas.

## 2.3 CANDIDATOS JÁ AVALIADOS EM ESTUDOS CLÍNICOS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Candidatos desenvolvidos originalmente como antifúngicos de uso oral, o posaconazol e o ravuconazol são inibidores da enzima C-14 $\alpha$  demetilase, interferindo na biossíntese de ergosterol de fungos e de *T. cruzi*. Os resultados dos estudos pré-clínicos demonstraram alta potência dos fármacos em estudos de atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Diniz *et al.*, 2013; Diniz *et al.*, 2018; Calvet *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2020; Olivieri *et al.*, 2010; Urbina *et al.*, 2003) No entanto, os resultados dos estudos de prova de conceito para o tratamento da doença crônica mostraram que apesar do efeito tripanossomicida, ambos os fármacos foram incapazes de exercer efeito prolongado e não induziram cura parasitológica em níveis satisfatórios, apesar do perfil favorável de segurança (Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2017; Torrico *et al.*, 2018). Resultados similares foram observados com a utilização combinada do posaconazol ao BZ (Morillo *et al.*, 2017). O estudo clínico BENDITA avaliou a eficácia de diferentes regimes de tratamento do BZ, assim como a combinação com o E1224. Os resultados reforçaram que tratamento de menor duração com BZ pode ter o mesmo efeito e maior tolerabilidade, contudo, não houve benefício adicional do tratamento combinado (Torrico *et al.*, 2021).

Em função das falhas terapêuticas dos azóis, diversos estudos foram desenvolvidos no sentido de revisitar o impacto deles na infecção pré-clínica, utilizando diferentes estratégias para avaliação do parasitismo *in vitro* e *in vivo*. Essas avaliações têm contribuído para refinar os modelos de avaliação de atividade anti-*T. cruzi*, introduzindo novos parâmetros no fluxo de avaliação de novos candidatos. Dentre eles, a recrudescência do parasitismo em culturas pós-*washout*, que agrega maior valor preditivo aos experimentos *in vitro* (Kratz *et al.*, 2022; Soeiro, 2022); e o “*time-kill*”, que seria um parâmetro para medir não só se a molécula candidata é ativa contra o parasito, mas em qual velocidade a atividade se dá. Nesse contexto, há o *fast-killing* - a exemplo do BZ e fexinidazol, e *slow-killing*, como os azóis. A partir desses estudos, tem sido estimulada a despriorização de moléculas inibidoras de CYP51 no processo de desenvolvimento farmacológico anti-*T. cruzi* (Cal *et al.*, 2016; Gabaldón *et al.*, 2023; Kratz *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2014). A justificativa para a invalidação dos inibidores de ergosterol no portfólio contra a doença de Chagas seria sua ação lenta e, sobretudo tripanostática – e não tripanocida - sobre o parasito,

tornando provável a reativação pós-tratamento. Nesse sentido, seriam menos efetivos para formas de *T. cruzi* de metabolismo lento, como tripomastigotas e, possivelmente, amastigotas dormentes (Soeiro *et al.*, 2022). Além disso, a identificação de possíveis mecanismos de resistência, como a existência de mutações em CYP51 de *T. cruzi* associada a resistência a múltiplos inibidores (Franco *et al.*, 2020).

Por outro lado, há poucos dados que relacionam essas características com a eficácia *in vivo*; ensaios que monitoraram parasitos dormentes pós-tratamento com BZ e nifurtimox, tidos como *fast-killing*, apresentam tanto ação tripanostática quanto tripanocida (Sanchez-Valdez, 2018; Resende *et al.*, 2020). Adicionalmente, ensaios *in vitro* que valorizam potência e time-kill sobre parâmetros farmacocinéticos *in vivo* podem desconsiderar moléculas que teriam excelente atividade *in vivo* (Tarleton, 2023).

Ainda em relação à falha terapêutica, em um estudo com azóis, Doumolin e colaboradores (2020) mostraram que embora proliferação lenta de *T. cruzi* parece ter impacto na susceptibilidade aos azóis, não seria suficiente para resultar em resistência. Os autores mostraram que o metabolismo da glutamina regulava o fluxo da via de biossíntese de esteróis em *T. cruzi*, modulando a eficácia dos azóis. Isso revela que a heterogeneidade metabólica do parasita pode explicar falhas terapêuticas em ensaios clínicos com azóis e sugere que manipular o metabolismo da glutamina pode melhorar a eficácia desses fármacos.

Contudo, são ainda escassas as discussões acerca de como questões farmacológicas podem impactar a eficácia dos tratamentos. Tanto para o posaconazol quanto para o E1224, a exposição aos fármacos alcançada em modelos experimentais foi de 5 a 10 vezes maior do que a obtida no tratamento dos pacientes. Dessa forma, os esquemas terapêuticos estabelecidos podem ter sido insuficientes para alcançar concentrações teciduais efetivas (Molina *et al.*, 2014; Torrico *et al.*, 2021; Villalta *et al.*, 2019).

O último candidato avaliado em estudo clínico para o tratamento de pacientes crônicos foi o fexinidazol, um composto 5-nitroimidazol aprovado para o tratamento da doença do sono (Deeks, 2019). Em avaliações comparativas aos azóis, o fexinidazol apresentou atividade *in vitro* tripanocida de ação rápida, sendo potencialmente superior aos azóis (Francisco *et al.*, 2015; Francisco *et al.*, 2016; Moraes *et al.*, 2014). A atividade anti-*T. cruzi in vivo* (Bahia *et al.*, 2012), atribuída aos seus metabólitos sulfona e sulfóxido (Bahia *et al.*, 2014), foi demonstrada em modelos murinos

infectados por diferentes cepas e nas fases aguda e crônica, com níveis de cura de até 80%, mesmo para cepas resistentes. Contudo, o efeito tripanocida na doença humana foi dependente de altas doses, as quais causaram neutropenia e disfunção hepática em cerca de 30% dos pacientes, sendo necessária a interrupção do estudo (Pinazo, 2024). Em um novo ensaio clínico, com utilização de doses mais baixas de fexinidazol, apesar da melhor tolerabilidade, o tratamento não foi capaz de sustentar a atividade antiparasitária após o tratamento; resultando em falha terapêutica em cerca de 80% dos casos – apenas 19% dos pacientes apresentaram resultados de PCR negativos nos 4 meses subsequentes de avaliação (Pinazo *et al.*, 2024).

Apesar de a realização dos estudos clínicos citados representarem um avanço da quimioterapia da doença de Chagas, a definição mais assertiva de modelos experimentais pré-clínicos adequados para a predição de candidatos e estratégias de maior potencial de sucesso clínico ainda é necessária (Machado *et al.*, 2020). Nesse sentido, é fundamental ampliar os conhecimentos acerca dos nichos de permanência do parasito e dinâmica da interação entre fármaco-hospedeiro-parasito em sistemas complexos.

#### 2.4 BIODISTRIBUIÇÃO TECIDUAL E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

*T. cruzi* apresenta tropismo celular diferente entre suas cepas, destacando células do sistema mononuclear fagocítico, células nervosas e musculares (Teixeira *et al.*, 2011; Andrade, 1996). Outros estudos apontam comportamento diferencial na infecção por cepas do parasito e entre as linhagens celulares hospedeiras, e ainda sugerem possíveis interações entre células infectadas e não-infectadas que influenciam na intensidade da infecção (Arias-Del-Angel *et al.*, 2020).

O tropismo tecidual de *T. cruzi* não é estático, e pode variar de acordo com o parasito e hospedeiro. A variabilidade genética do parasito influencia sua distribuição tecidual, com diferenças de populações ou subpopulações parasitando órgãos como coração e esôfago (Vago *et al.*, 2000). Ainda, considerando o genotipagem de diferentes órgãos, a técnica de PCR permitiu identificar diferentes populações genéticas no mesmo paciente (Vago *et al.*, 2000). Além disso, o tempo de infecção e organismo hospedeiro, independente da linhagem do parasito, via de infecção ou dose, são fatores relevantes (Añez e Crisante, 2020).

Em pacientes crônicos, a detecção da carga parasitária é visualizada em tecidos como coração na forma cardíaca (Vago *et al.*, 1996; Vago *et al.*, 2000); esôfago e cólon na forma digestiva (Freitas *et al.*, 2005; Vago *et al.*, 2000); e em sangue com sensibilidade variável, relatado com carga parasitária menor do que em tecidos quando realizada detecção na fase crônica (Caldas *et al.*, 2012; Cummings e Tarleton, 2003; White *et al.*, 2025). Diferentes tecidos podem ser submetidos a quantificação de carga parasitária por qPCR, como músculo esquelético, pele, líquido, fígado, rins entre outros, o modelo experimental e fase da doença vão delinear as escolhas dos testes diagnósticos mais apropriados, entre os quais a qPCR (Andrade *et al.*, 2002; Strauss *et al.*, 2018; Valadares *et al.*, 2008).

Quando observados os dados histológicos em relação a distribuição do parasitismo tecidual nas infecções experimentais, principalmente em modelos murinos, é evidenciado que *T. cruzi* pode invadir praticamente todos os tecidos, com predomínio em coração, músculo esquelético, trato gastrointestinal e pele, variando conforme a fase da infecção e o modelo experimental. Essa distribuição multifocal é fundamental para a patogênese e persistência do parasito na evolução clínica da doença de Chagas.

As formas evolutivas amastigotas são frequentemente detectadas em células cardíacas, formando os chamados ninhos de amastigotas intracelulares, principalmente na fase aguda da DC, o que pode desencadear inflamação mononuclear intensa, que mais tarde pode evoluir para fibrose e lesão crônica (Guarner *et al.*, 2001; Fabrino *et al.*, 2011).

No músculo esquelético e trato gastrointestinal as amastigotas também são observadas, especialmente no cólon, local que o parasito forma, em poucas células, ninhos com uma grande quantidade de amastigotas, principalmente em infecções crônicas (Ward *et al.*, 2020). Pâncreas, pele e ocasionalmente células do sistema nervoso central, como astrócitos e células endoteliais infectadas foram mostrados infectados (Guarner *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2020).

Quando comparada a distribuição da infecção segundo estudos de histologia na fase aguda e crônica, o parasitismo na fase aguda é difuso em múltiplos órgãos como, coração, fígado, baço, medula óssea e músculo esquelético, enquanto na fase crônica a carga parasitária é bem menor e se restringe em alguns focos (Añez e Crisante, 2020; Guarner *et al.*, 2001; Melo e Brener, 1978; Ward *et al.*, 2020;).

Adicionalmente, evidências têm se acumulado ainda a respeito do tecido adiposo constituir um nicho de manutenção do parasito (Lizardo *et al.*, 2021; Nagajyothi *et al.*, 2012), sendo destacado como um local de latência e modulação metabólica (Nagajyothi *et al.*, 2012; Tanowitz *et al.*, 2017). O tecido adiposo é constituído principalmente por adipócitos que desempenham papel na regulação do sistema imunológico (Kumari *et al.*, 2018) e homeostase metabólica (Choe *et al.*, 2016; Dragoo *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2016), ainda atuando como um órgão endócrino para reserva energética e associação com atividades termogênicas (Frigolet e Gutierrez-Aguilar, 2020).

Em 2005, o potencial impacto do parasitismo em adipócitos começou a ser elucidado (Combs *et al.*, 2005), e a constatação de persistência no tecido adiposo já foi demonstrada em pacientes chagásicos crônicos (Ferreira *et al.*, 2011). Mesmo após esses achados, o papel do parasitismo do *T. cruzi* em tecido adiposo sobre as respostas terapêuticas ainda não foi explorado em estudos que investiguem a ação de fármacos nesse tecido.

Técnicas modernas de imagem *in vivo* têm permitido identificar que tecidos usualmente não explorados, como a pele, são frequentemente parasitados na fase crônica da infecção murina (Ward *et al.*, 2020). Outros estudos mostram a persistência crônica do parasito no trato gastrointestinal, especialmente cólon e estômago, que atuariam como reservatórios (Lewis *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2020).

Apesar de uma potente resposta imune desencadeada pelos hospedeiros vertebrados, *T. cruzi* mantém infecções crônicas de longa duração, parasitando diversos tipos celulares por meio de ciclos de multiplicação intracelular (Nagajyothi *et al.*, 2012), mesmo após ciclos de tratamento etiológico prolongado. A resistência/susceptibilidade natural de *T. cruzi* em modelos murinos tratados com BZ é descrita por Filardi e Brener (1987) e conhecida há décadas. Contudo, os mecanismos que explicam a persistência natural do parasito frente à quimioterapia não são claros, o que dificulta a compreensão da reativação da infecção frente aos fármacos utilizados no tratamento etiológico. Essa persistência é observada na infecção experimental com determinadas cepas do parasito, ainda na fase aguda (Bustamante *et al.*, 2014; Caldas *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2013; Diniz *et al.*, 2010; Guedes *et al.*, 2004; Mazzeti *et al.*, 2018).

Diversos trabalhos têm investigado mutações no genoma em clones de parasitos resistentes ao BZ (Campos *et al.*, 2017), com destaque para genes de

nitroreduases (TcNRT-1) e transportadores ABC (Petraovicus *et al.*, 2019). Apesar de o caráter de resistência a fármacos poder ser induzido *in vitro* e *in vivo* evidências como a resistência natural de populações silvestres aos fármacos (Filardi e Brener, 1987), bem como a ausência de resistência *in vitro* para cepas resistentes *in vivo* (Diniz *et al.*, 2018) e aumento dos níveis de cura com alteração de esquema terapêutico refutam a exclusividade de resistência genética (Sanchez Valdez *et al.*, 2018).

Foi descrito recentemente um possível mecanismo de manutenção da infecção envolvendo as formas amastigotas do parasito. Os autores demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, a presença de parasitos intracelulares dormentes, de forma espontânea os quais permanecem por longos períodos sem replicar e ainda resistem a períodos prolongados à pressão de fármacos (Sanchez-Valdez *et al.*, 2018). Essa dormência não foi totalmente elucidada, mas há a constatação de que os parasitos dormentes resistem no mínimo a 30 dias de tratamento com BZ, e dão continuidade à infecção em modelos *in vitro* e *in vivo*, assim como as formas amastigotas evoluem naturalmente para formas tripomastigotas (Sanchez-Valdez *et al.*, 2018).

Identificar os tecidos células nas quais o parasito persiste é crucial para compreender como *T. cruzi* escapa da eliminação pela resposta imune ou sob pressão farmacológica.

## 2.5 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS

A relação entre a distribuição tecidual e resposta imune pode influenciar a dinâmica da infecção na DC. A resposta imune local varia de acordo com o tecido parasitado; durante a infecção aguda o organismo do hospedeiro expande sua ativação de linfócitos T e B; essas respostas são reguladas por citocinas e pela permanência do parasito em cada tecido (Meis *et al.*, 2009). A persistência do parasitismo em diversos tecidos, em especial aqueles considerados órgão-alvo, está associada à ativação de respostas imunes locais, com presença de infiltrados de linfócitos T e produção de citocinas inflamatórias (Cardillo *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2023; Souza-Silva *et al.*, 2024).

As respostas Th1, Th2 e Th17 tem papéis distintos na resposta imune na DC; a Th1 é fundamental para o controle do *T. cruzi*, promovendo ativação de macrófagos e eliminação do parasito. Porém, quando exacerbada, é associada à inflamação

crônica e relação com desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica (Braga *et al.*, 2022; Guedes *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2014). Por sua vez, a resposta Th2 estimula secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, atuando na regulação da resposta inflamatória; ao auxiliar no equilíbrio da inflamação, pode limitar danos teciduais (Alba-Alvarado *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2014). Já em relação ao perfil de resposta Th17, a citocina IL-17 atua no recrutamento de neutrófilos favorecendo a eliminação do parasito (Braga *et al.*, 2022; Cai *et al.*, 2016); níveis adequados de Th17 podem proteger de cardiopatias (Alba-Alvarado *et al.*, 2018; Guedes *et al.*, 2012); além de oferecer maior proteção sistêmica e mucosa na infecção gástrica por *T. cruzi* (Cai *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2021).

A resposta Th1 é originada na diferenciação de linfócitos T CD4+ estimulada por IL-12 e IFN- $\gamma$ , entre suas principais funções está a ativação de macrófagos, aumentando a capacidade microbida; e o estímulo de linfócitos T CD8+, essenciais na defesa contra patógenos intracelulares como vírus, bactérias e protozoários (Butcher e Zhu, 2021; Luo *et al.*, 2022; Martynova *et al.*, 2022).

A diferenciação mediada por IL-4 estimula a resposta Th2, com produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estão envolvidos na ativação de eosinófilos, basófilos e mastócitos; produção de IgE através de linfócitos B. Esse tipo de resposta atua contra patógenos extracelulares, como os helmintos. A estimulação exacerbada pode inibir a resposta Th1 (Butcher e Zhu, 2021; Martonik *et al.*, 2021).

O subtipo de células T auxiliares Th17 é estimulado pela produção de citocinas IL-6, TGF- $\beta$  e IL-23, que produzem citocinas IL-17, IL-21 e IL-22; no qual atuam no recrutamento e ativação de neutrófilos na defesa contra bactérias extracelulares e fungos, além de participarem em processos autoimunes e inflamatórios (Butcher e Zhu, 2021; Luo *et al.*, 2022; Martonik *et al.*, 2021).

Considerando esses conceitos, o IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória importante na ativação de macrófagos, indução de óxido nítrico e ação antiparasitária, está associado a uma resposta Th1 ativa característica na fase aguda por infecção de *T. cruzi* (Salim, Sershen e May, 2016). A redução dessa citocina após o tratamento indica a diminuição do estímulo antigênico, portanto diminuição da resposta exacerbada do sistema imune, como a Th1. Assim como o IFN- $\gamma$ , a TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória crucial na resposta imune inicial contra parasitos, envolvida na ativação de macrófagos e recrutamento celular (Li, Körner & Liu, 2020).

A citocina IL-6 apresenta função pró-inflamatória pleiotrópica (Kaur *et al.*,

2020), agindo na imunidade inata e adaptativa, por estar envolvida da ativação e diferenciação de linfócitos B e T; recrutamento de células inflamatórias (Schett, 2018). Na fase aguda da DC os níveis de IL-6 são altos, indicam a inflamação sistêmica, participação na resposta imune inicial e potencial papel na patogênese tecidual (miocardite chagásica aguda) (Amioka *et al.*, 2021; Degener *et al.*, 2020).

Já a citocina IL-10 quando aumentada, desempenha papel anti-inflamatório importante na regulação da resposta imune do hospedeiro limitando a produção de citocinas pró-inflamatórias como, IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  e IL-12 (Carlini *et al.*, 2023; Hutchins, Diez e Miranda-Saavedra, 2013; Saraiva e O'Garra, 2010) e prevenindo danos teciduais (Boari *et al.*, 2012; Roffê *et al.*, 2012).

Em pacientes sintomáticos existe a correlação entre níveis elevados de citocinas inflamatórias no sangue e a expressão gênica inflamatória no tecido cardíaco, indicando que a inflamação sistêmica reflete a resposta imune local (Souza-Silva *et al.*, 2024).

Na ausência de tratamento ou em função da falha terapêutica, a persistência do parasito estimula respostas imunes crônicas que não eliminam o parasito por completo e causam lesões teciduais em função da inflamação, seguidas de fibrose cardíaca. Nesse sentido, o uso de medicamentos que não permeiam todos os reservatórios teciduais pode constituir um obstáculo para o sucesso do tratamento (Ernst, Macedo e McCall, 2025), permitindo a evolução do processo patológico. Nesses casos, o desequilíbrio entre a resposta protetora favorece o dano tecidual e evolução clínicas graves (Acevedo, Girard e Gómez, 2018; Cardillo *et al.*, 2015; Ernst, Macedo e McCall, 2025; Gómez *et al.*, 2023; Puerta *et al.*, 2023).

O padrão de distribuição tecidual e a intensidade da resposta imune variam de acordo com a genética do hospedeiro (Domingues *et al.*, 2020; Dutra *et al.*, 2009), além da diversidade do parasito, que possui tropismo tecidual distinto com capacidade de modular a resposta imune local e sistêmica (Desale *et al.*, 2025), ambos fatores influenciam no tipo da manifestação clínica da DC.

Para entender a progressão clínica e o desenvolvimento da forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas, por exemplo, é fundamental analisar o perfil de citocinas. Há vários perfis de ativação encontrados em pacientes com DC, que podem ser atribuídos a carga infecciosa, a via de infecção, genética/virulência do parasito e do hospedeiro, a influência de fatores neuroendócrinos na resposta adaptativa, entre outros (Acevedo, Girard e Gómez, 2018; Morrot *et al.*, 2016).

No geral, em pacientes com a forma clínica indeterminada da DC apresentam maior expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ , com perfil regulador anti-inflamatório, ou seja, o equilíbrio da resposta imune e controle do parasito (Da Silva *et al.*, 2017; Dutra *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2021). Essa resposta está associada com proteção cardíaca e controle do parasito com menor dano tecidual, enquanto a expressão de citocinas inflamatória tem relação com o agravamento cardíaco (Sousa *et al.*, 2014; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008).

O perfil de citocinas em pacientes com a forma clínica cardíaca apresenta um aumento dos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-17, citocinas inflamatórias que estão diretamente relacionadas com uma progressão ruim da função cardíaca e maior risco de lesão tecidual (Da Silva *et al.*, 2017; Dutra *et al.*, 2014; Ramos-Rincón *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2014; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008). O equilíbrio entre citocinas inflamatórias e reguladoras é determinante para o desenvolvimento ou não de cardiomiopatia (Da Silva *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2023).

Há estudos que mostram o tratamento antiparasitário ou tratamento incompleto nem sempre vão ter fracasso na eliminação do parasitismo, mas podem restaurar o equilíbrio imunológico quando é completo (Eiro *et al.*, 2021; Vallejo *et al.*, 2016). No entanto os fatores imunológicos envolvidos na expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatória, como TNF- $\alpha$ , acarretam piores resultados e desfechos clínicos (Cristovão-Silva *et al.*, 2021; Pérez-Fuentes *et al.*, 2003).

Eiro e colaboradores (2021), investigaram a interrupção do tratamento com BZ e o desfecho na imunidade. Foi demonstrado que essa interrupção está associada a redução de níveis de anticorpos específicos do *T. cruzi*, e ainda aumentam recrutamento de células T. Outro achado relevante, mostrou que tanto regime completo ou não de tratamento, a taxa de eficácia foi semelhante, visto a redução de células específicas para eliminação do parasito (Eiro *et al.*, 2021).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PARASITOS

Foram utilizadas cepas de *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de resistência à quimioterapia com BZ e ravuconazol. Ambas as cepas são bem caracterizadas na literatura em modelo murino, induzindo fase aguda com parasitemia patente e processo inflamatório intenso, particularmente em tecidos musculares. Tais cepas são mantidas criopreservadas no banco de cepas do laboratório de Parasitologia Básica da UNIFAL-MG e obedecendo as passagens sucessivas em camundongos para fins de experimentação. Foram realizadas três sucessivas passagens da cepa Colombiana, advindas de sangue; e três passagens de cepa CL Brener com tripomastigotas originados de metaciclogênese de epimastigota em cultura segundo protocolo de Sullivan (1982).

A cepa Colombiana é classificada como DTU I (Zingales *et al.*, 2009), com características de alta virulência, resistência ao tratamento com BZ e nifurtimox, tripomastigotas de formas largas (Andrade *et al.*, 1970a; Andrade, 1974b; Filardi e Brener, 1987). O parasito foi isolado de um paciente cardíaco em 1964 (Federici, Abelmann, Neva, 1964).

Já a cepa CL Brener (clone da cepa CL (Zingales *et al.*, 1997)), pertence à DTU VI (Zingales *et al.*, 2009), isolada do vetor *Triatoma infestans* no Brasil em 1963 (Brener e Chiari, 1963), é uma linhagem híbrida com alta virulência e infectividade, descrita com características miotrópicas (Lenzi *et al.*, 1996; Melo e Brener, 1978), e susceptibilidade ao tratamento com os fármacos de referência (Filardi e Brener, 1987).

#### 3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

(i) Benznidazol (Bz): 2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitro-1imidazoleacetamide), (Lafepe), o fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas; 1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-thiazolyl]benzonitrile); (ii) E1224 (pró-fármaco): [(2*R*,3*R*)-3-[4-(4-cianofenil)-1,3-tiazol-2-il]-2-(2,4-difluorofenil)-1-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-il]oximetil di-hidrogenofosfato, derivado de monolisina fosfato do ravuconazol (Eisai, Japão), molécula desenhada para ensaios pré-clínicos da quimioterapia da DC.

O BZ foi administrado por via oral em suspensão preparada com

carboximetilcelulose (Sigma) 0,5% p/v. O E1224 foi administrado por via oral em solução aquosa. Os tratamentos foram realizados por 5 dias consecutivos com uma dose diária de 100mg/Kg de BZ ou doses diárias de 50mg/Kg de E1224 (pró-fármaco do ravuconazol). Essas doses correspondem ao tratamento padrão estabelecido na literatura para avaliações pré-clínicas em modelo murino (Filardi e Brener, 1987; Diniz *et al.*, 2018). Para indução de cronificação da infecção pela cepa Colombiana, um grupo de 7 animais recebeu uma dose de 400mg/kg de BZ (Bustamante *et al.*, 2020). Nos animais infectados com a cepa CL Brener não foi realizada a indução de cronificação.

### 3.3 ANIMAIS

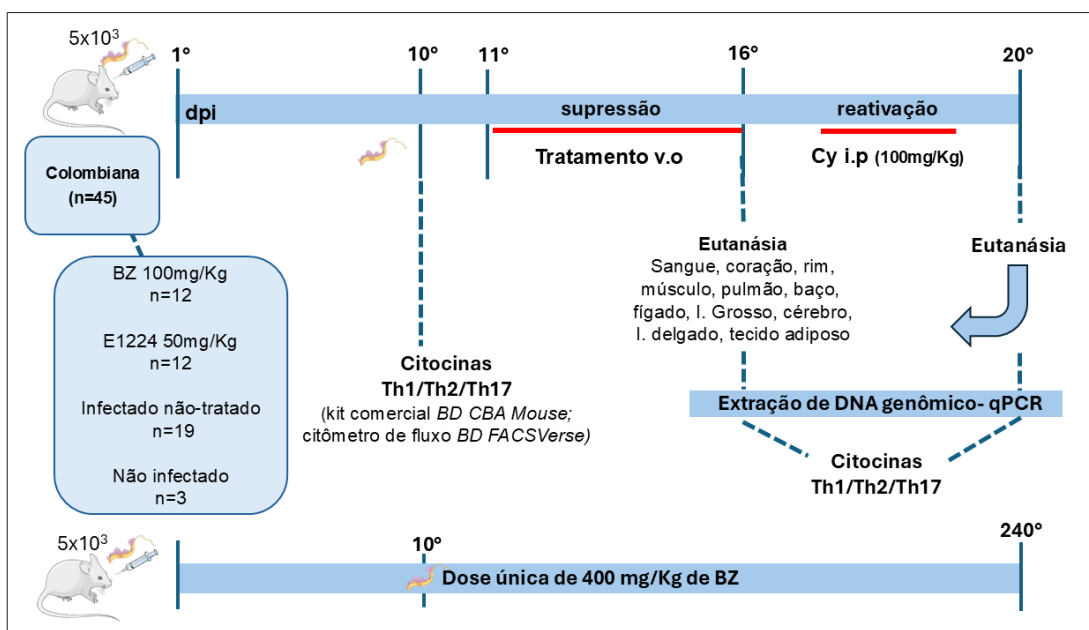
Foram utilizadas 64 fêmeas de camundongos BALB/c, com 4 semanas de idade, pesando entre 18 e 24g. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com ciclos regulares de luz, temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e somente após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas com número de registro 0046/2021.

#### 3.3.1 Grupos experimentais

As Figuras 3 e 4 ilustram a distribuição dos grupos experimentais e os procedimentos encontram-se descritos nos itens subsequentes.

Foram utilizados 64 animais, sendo 45 para cepa Colombiana, infectados e tratados com os fármacos testados (n=12/fármaco) ou mantidos como controles infectados (n=18/cepa) ou não infectados (n=3). E 19 animais infectados com cepa CL Brener e tratados com benznidazol (n=12/fármaco) ou controle infectados sem tratamento (n=4), e animais sem infecção (n=3). Outros 7 animais constituíram o grupo controle infectado cronicamente com cepa Colombiana (n= 7).

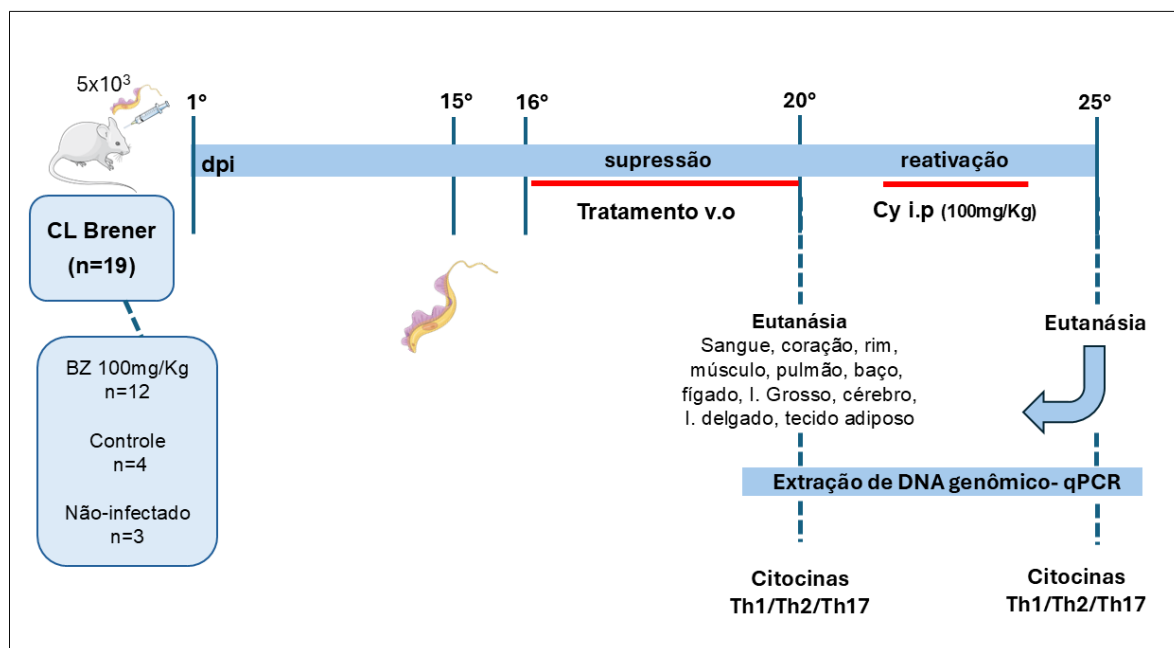
Figura 3- Fluxograma dos grupos experimentais utilizando cepa Colombiana de *T. cruzi*.



Fonte: Autoria própria.

Nota: O pico de parasitemia no 10º dia, início do tratamento do 11º dia de infecção até o 16º dia. Em seguida, os animais que receberam imunossupressor foram eutanasiados aos 20 dias de infecção. Animais crônicos foram infectados experimentalmente, tratados em dose única na fase aguda (10 dias) e eutanasiados na fase crônica (240 dias).

Figura 4- Fluxograma dos grupos experimentais utilizando cepa CL Brener de *T. cruzi*.



Fonte: Autoria própria.

Nota: O pico de parasitemia no 15º dia, início do tratamento do 16º dia de infecção até o 20º dia. Em seguida, animais que receberam imunossupressor foram eutanasiados aos 25 dias dpi.

### 3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL, AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA E IMUNOSSUPRESSÃO

Os animais foram inoculados via intraperitoneal (i.p) com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana ou CL, obtidas a partir de sangue periférico de camundongos infectados. Após a confirmação da infecção por exame de sangue a fresco no 10º dia, os animais infectados foram randomizados nos grupos tratados com BZ (100mg/kg), com E1224 (50mg/Kg) e não tratados. O tratamento foi mantido por 5 dias. Um dia após o tratamento, 6 animais de cada grupo tratado foram imunossuprimidos com uma dose diária de 100mg/Kg de ciclofosfamida (Cy) (Baxter), via i.p., por 3 dias (Figura 3). Durante todo o período de avaliação a parasitemia foi quantificada diariamente e o peso dos animais aferido a cada 5 dias.

Os experimentos com a cepa CL Brener seguiram o mesmo delineamento, contudo, foi utilizado somente o fármaco de referência, BZ, e o tratamento teve início aos 15 dias após a infecção (Figura 4).

#### 3.4.1 Coleta e armazenamento de amostras

Para a obtenção de plasma utilizado na quantificação de citocinas foram coletadas amostras de sangue, via punção cardíaca, em tubos com anticoagulante e em banho de gelo. As amostras foram imediatamente centrifugadas sob refrigeração e armazenadas a -80º até a utilização. As coletas de tecidos e órgãos destinados à quantificação do parasitismo por *qPCR* nos animais infectados e tratados ou não, foram realizadas em dois períodos (figuras 3 e 4) - imediatamente após o tratamento e após a imunossupressão, para permitir mapear os órgãos e tecidos onde há redução e/ou recrudescência do parasitismo, na expectativa de correlacionar com o perfil de susceptibilidade da cepa.

É importante ressaltar que todos os fragmentos foram coletados de forma padronizada (20-30mg), de forma a permitir a comparação. Após a coleta, os fragmentos foram exaustivamente lavados em solução salina tamponada e os instrumentos descontaminados entre um tecido e outro, de forma que a determinação da carga parasitária refletisse a quantidade de parasitos intracelulares. Foram coletados, além do sangue, coração, músculo esquelético, baço, fígado, rins, cérebro, pulmão, tecido adiposo branco inguinal, intestino delgado e intestino grosso. Os

órgãos/fragmentos foram armazenados em microtubos estéreis livres de DNase/RNase e então armazenados a -80°C.

### 3.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração de DNA genômico foi realizada a partir do sangue e de diferentes tecidos de camundongos. Foram utilizados os kits de extração de DNA ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System e ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. Para os tecidos foi incluído uso de pistilos para maceração. As amostras corresponderam ao volume de 200 µL de sangue e fragmentos de cerca de 20-30 mg provenientes do baço, coração, rim, fígado, músculo esquelético, cérebro, tecido adiposo, intestino grosso, intestino delgado e pulmão.

#### 3.5.1 Padronização de estratégia de quantificação de DNA pelo método do Ct comparativo

Para cada tecido, foi gerada uma curva padrão a partir de uma concentração conhecida de DNA de formas epimastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, em combinação com uma quantidade conhecida de DNA do tecido correspondente. Essas amostras foram submetidas a diluições seriadas (1:10) em água. Dessa forma, o limite de quantificação e a eficiência de amplificação da qPCR para os alvos *T. cruzi* e o controle endógeno TNF- $\alpha$  foram determinados individualmente para cada tecido. A estratégia de quantificação adotada baseou-se no método do delta Ct ( $\Delta$ Ct) comparativo. Em todas as análises, foi utilizada uma amostra padrão de referência específica para cada tecido, contendo quantidades conhecidas de DNA do parasito e do tecido. Essa abordagem permitiu a conversão dos resultados de quantificação relativa em valores absolutos de equivalentes de parasito por ng de DNA tecidual.

### 3.6 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2 µL de DNA genômico (50 ng), 0,3 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a

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

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM PLASMA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Essa etapa foi realizada na Plataforma de Citometria do Fluxo do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto - MG (UFOP) em colaboração com professor Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares. A leitura foi realizada de acordo com protocolo de Mathias e colaboradores (2023).

Para as amostras de citocina foi realizada coleta de sangue periférico; no 10° e 16° dia de infecção para cepa Colombiana; e 20° e 25° dia para cepa CL Brener. Para a quantificação foi utilizado *kit mouse-Th1/Th2/Th17 cytokine (BD Biosciences,*

*San Jose, USA*), de acordo com a técnica de *Cytometric Bead Array* que permite a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de plasma coletadas e armazenadas em freezer -80°C foram descongeladas e homogeneizadas; em seguida centrifugadas a 10.000 x g durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para as análises. Foram utilizados 25 uL de cada amostra (n=61) por poço de uma placa de 96 poços adicionadas a 3 uL da mistura de *Beads* (7 beads) previamente homogeneizadas por aproximadamente 40 segundos. A curva padrão foi reconstituída em 2,0 ml de Reagente G, uma solução tampão usada como diluente, nas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256, no mesmo volume das amostras. Foram adicionados 17uL aos poços, seguidos de um reagente de detecção marcado com ficoeritrina (PE) e as placas incubadas com agitação por 3 horas a 25°C, ao abrigo da luz. Ao finalizar a incubação, os poços foram lavados com 500  $\mu$ L da solução tamponada de lavagem, e 160uL foram mantidos nos poços e centrifugados a 1400 rpm por 7 min a 25°C. O sobrenadante foi descartado, e uma nova adição de 180 a 200  $\mu$ L de Reagente F e transferidos para os tubos de leitura. Para aquisição dos dados foi empregado o citômetro de fluxo *LSRFortessa™*, *BD Biosciences*. A quantificação foi dada em picogramas por mililitro (pg/mL) e calculadas através do software FCAP v.3 (*BD Biosciences, San Jose, USA*).

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software GraphPrism 8.0.2*. Para comparações múltiplas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney. Foram consideradas significativas as diferenças se  $p < 0,05$ .

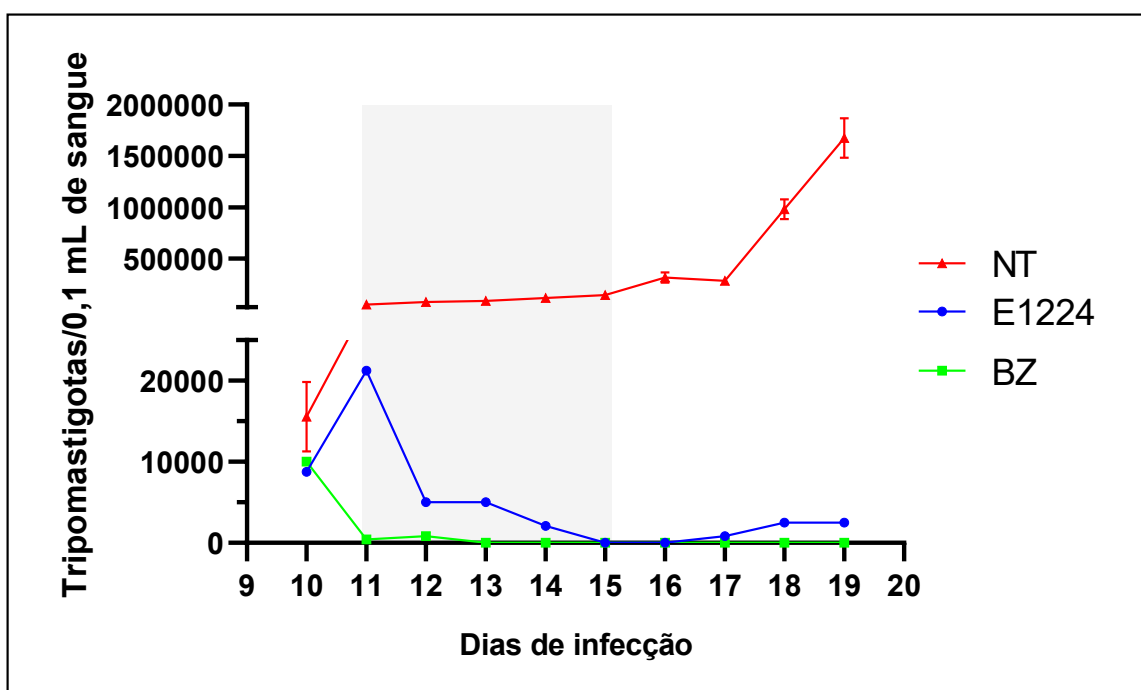
## 4 RESULTADOS

### 4.1 CEPA COLOMBIANA

#### 4.1.1 Impacto dos fármacos na parasitemia durante e após o tratamento

A parasitemia dos animais infectados pela cepa Colombiana, acompanhada durante o período de 10 dias, é mostrada na Figura 5. A ação antiparasitária de ambos os fármacos é claramente demonstrada a partir da administração da segunda dose, sendo a redução da parasitemia mais acentuada para os animais tratados com BZ. Enquanto este fármaco suprimiu a parasitemia em 100% dos animais a partir da terceira dose, para o E1224 foi observada supressão em 83,3% (5/6 animais) no último dia de tratamento.

Figura 5- Supressão da parasitemia pelo benznidazol e E1224 em camundongos infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.



Fonte: Autoria própria

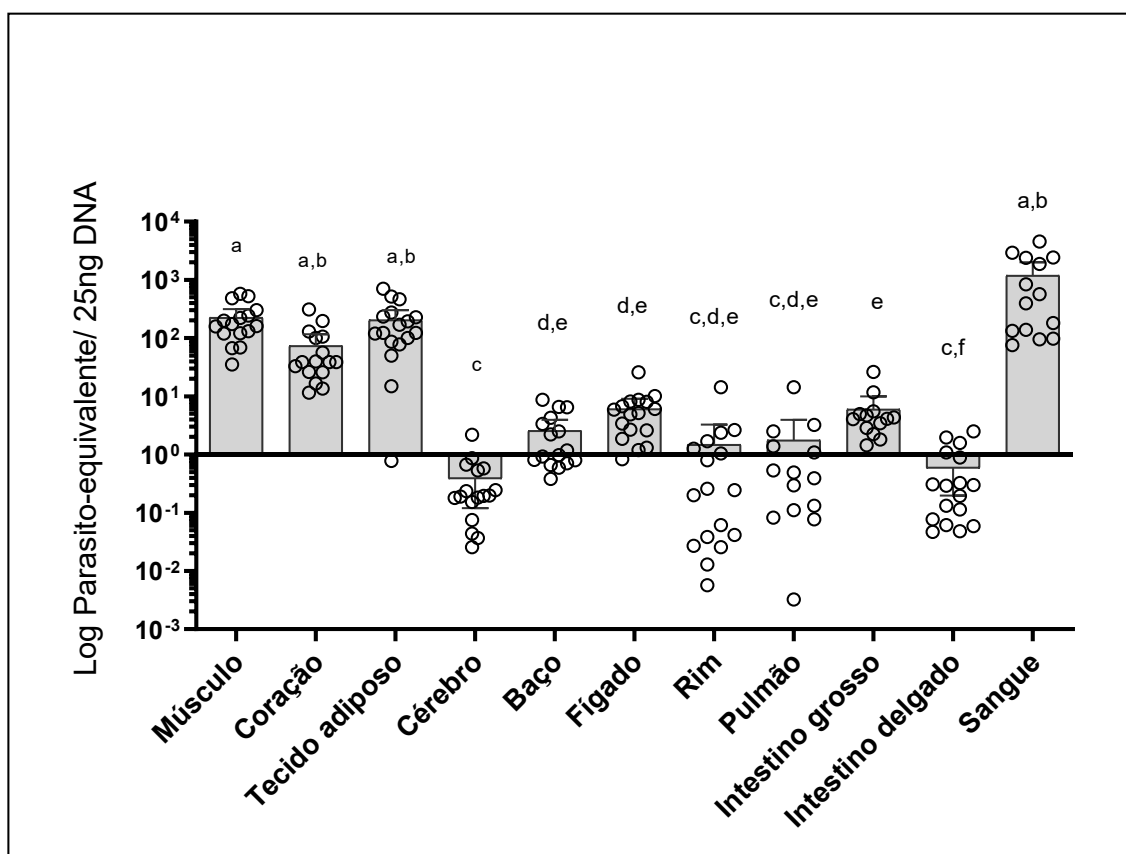
Nota: Camundongos BALB/c foram inoculados (0,1 mL) com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas, via ip e tratados por 5 dias, via oral, com 100 mg/Kg de benznidazol (BZ) ou 50 mg/Kg de E1224. A parasitemia foi detectada por exame de sangue a fresco. NT-Infetado e não tratado; BZ- benznidazol 100mg/kg; E1224 – E1224 50mg/kg. A área sombreada cinza representa o período de tratamento.

Para otimizar a detecção do parasitismo, 48 horas após cessar o tratamento os animais foram imunossuprimidos. Ainda assim, todos os animais tratados com Bz permaneceram com parasitemia subpatente, enquanto para o E1224 foi detectada parasitemia patente em 2 dos 6 animais (33%).

#### 4.1.2 Carga parasitária tecidual da cepa colombiana por qPCR

Inicialmente foi analisada a distribuição tecidual da cepa Colombiana na fase aguda da infecção murina. A Figura 6 mostra a carga parasitária quantificada nos diferentes órgãos e tecidos dos animais controle, considerando os tempos de infecção de 16 e 20 dias.

Figura 6- Distribuição tecidual da cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos BALB/c na fase aguda da infecção.



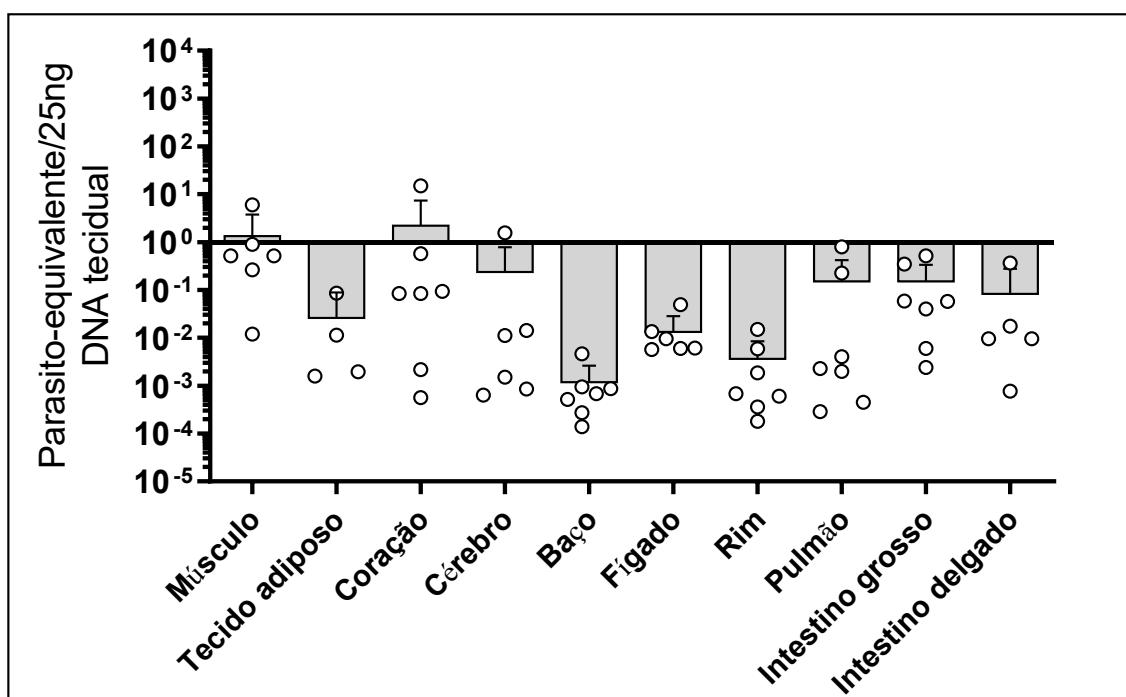
Fonte: Autoria própria.

Nota: Carga parasitária de tecidos e sangue, detectada por PCR na fase aguda da infecção (20 dias) de camundongos BALB/c pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Letras iguais indicam similaridade estatística. Valores dados em parasito-equivalente por 25ng/DNA.

Os órgãos/ tecidos com maior carga parasitária foram músculo esquelético, tecido adiposo e coração; com médias de 224,4, 173,7 e 73,94 par-eq, respectivamente (Figura 6). Essas médias foram similares à quantificada no sangue, enquanto todos os outros tecidos apresentaram níveis de DNA de *T. cruzi* significativamente menores do que o observado no sangue (Figura 6). Níveis baixos de parasitismo foram detectados no baço, fígado e intestino grosso, enquanto cargas parasitárias mínimas, menores que 1 par-eq/ 25ng DNA foram detectadas no cérebro, rim e pulmão.

Já na fase crônica da infecção pela mesma cepa, o parasitismo foi drasticamente reduzido, como evidenciado pelos dados mostrados na Figura 7. É interessante notar que, diferente da fase aguda, quando o parasitismo dos tecidos musculares e adiposo foi significativamente maior, na fase crônica não houve diferença entre esses e os demais órgãos analisados.

Figura 7- Distribuição tecidual da cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos BALB/c na fase crônica da infecção.



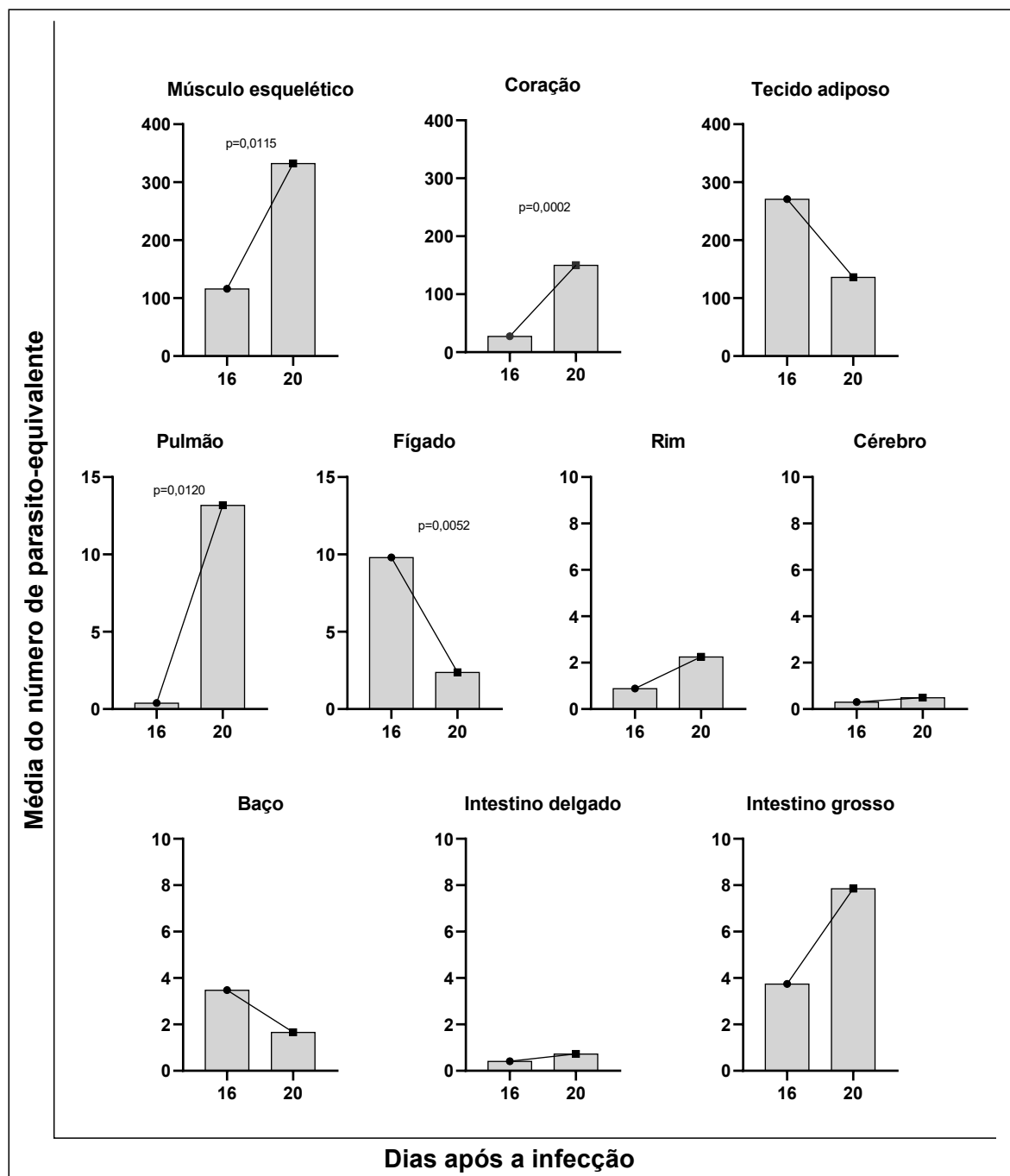
Fonte: Autoria própria.

Nota: Carga parasitária detectada por PCR em todos os tecidos coletados de animais com 240 dias de infecção crônica por cepa Colombiana de *T. cruzi*. Não houve diferença estatística entre os tecidos analisados. Valores dados em parasito-equivalente por 25ng/DNA.

Buscando compreender a dinâmica do parasitismo pela cepa Colombiana ao

longo da infecção aguda (16 e 20 dias pós-infecção), os dados foram classificados separadamente em uma análise comparativa nos dois períodos (Figura 8).

Figura 8- Biodistribuição da cepa Colombiana de *T. cruzi*, aos 16 e 20 dias pós-infecção.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Quantificação do parasitismo por PCR em tecidos de animais infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi* sem tratamento. Figura representativa para todos os órgãos coletados, com valores médios de parasito-equivalente. Estão representados os valores de *p* apenas para os tecidos nos quais a diferença foi significativa entre o 16º e 20º dia de infecção.

Foram detectadas flutuações distintas da carga parasitária, a depender do tecido avaliado. No baço, tecido adiposo, cérebro, rim e intestinos a quantidade de DNA de *T. cruzi* foi similar nos dois períodos; apesar das tendências de queda nos dois primeiros e elevação nos demais, dada a dispersão dos valores, a diferença não foi significativa. Já no coração e músculo esquelético foi detectado aumento significativo da carga parasitária no 20º dia. Curiosamente, no pulmão também foi detectado aumento relevante. Por outro lado, no fígado, a carga parasitária foi significativamente reduzida com maior tempo de infecção, a despeito da crescente parasitemia (Figura 8).

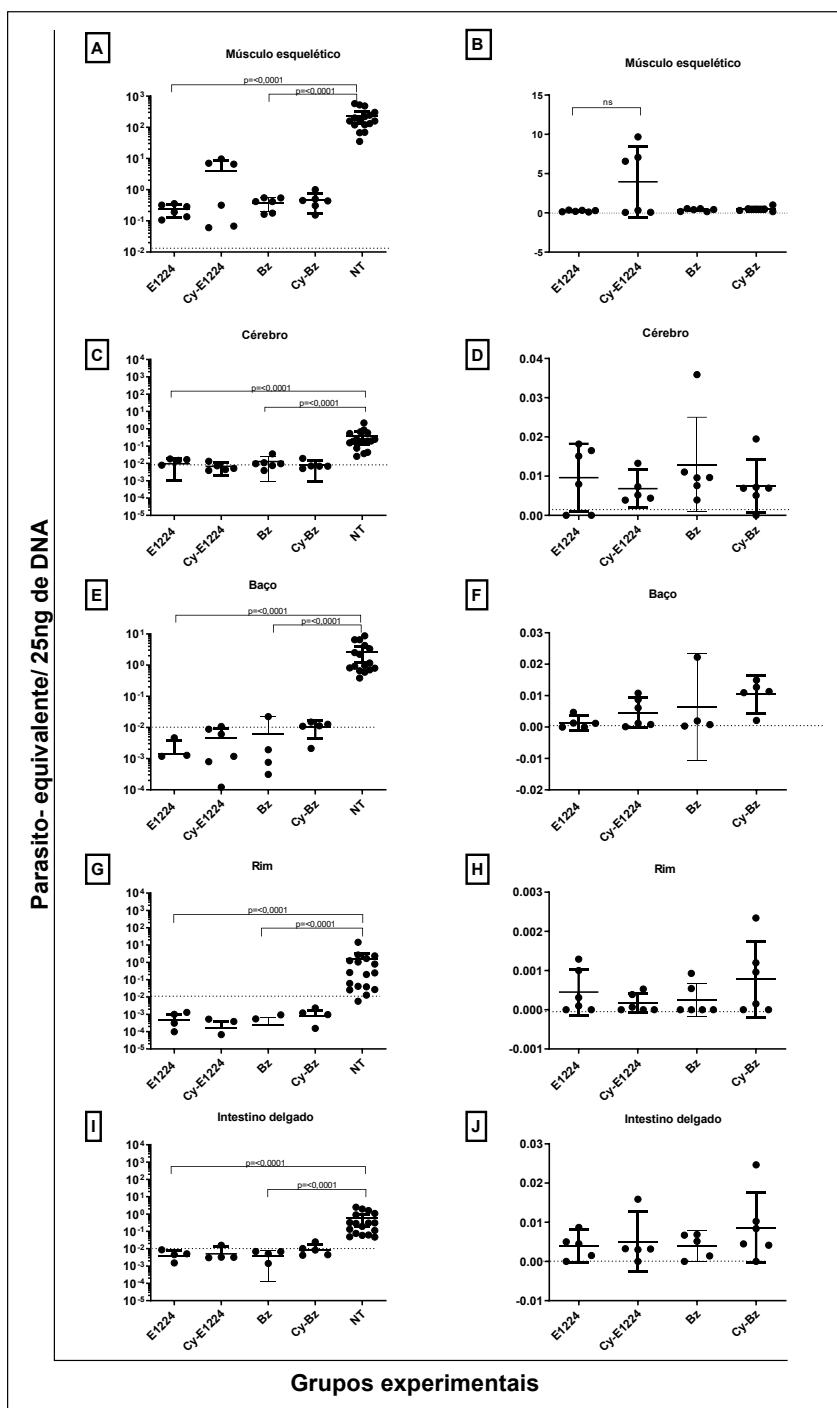
#### **4.1.3 Influência dos tratamentos na carga parasitária da cepa Colombiana detectada por qPCR**

Os tratamentos com BZ e E1224 foram altamente eficazes em controlar o parasitismo tecidual. A Figura 9 mostra a carga parasitária encontrada nos diferentes tecidos. Para permitir melhor visualização das diferenças, no painel esquerdo estão representados os tecidos de todos os animais infectados, tratados ou não, enquanto no painel à direita foi apresentada a carga parasitária dos tecidos dos animais tratados, sendo excluído o grupo controle.

Pode ser observado que no músculo esquelético, baço, cérebro, rim e intestino delgado os tratamentos com E1224 e BZ induziram redução significativa do parasitismo em relação ao grupo não-tratado (Figura 9A), sendo a carga parasitária dos animais tratados com o fármaco de referência similar ao azol.

A avaliação do parasitismo logo após interrupção do tratamento (16º dia de infecção) e após a imunossupressão (20º dia de infecção) mostrou valores similares. No músculo esquelético e rim houve aumento da carga parasitária resultante da imunossupressão em alguns animais tratados com E1224 e BZ, respectivamente. Porém, as médias desses grupos ainda foram similares àquelas observadas imediatamente após o tratamento. Esses dados podem sugerir que os tecidos mencionados não são sítios de reativação do parasitismo pós-tratamento, independente do fármaco, ou que o tempo pós-tratamento investigado não foi suficiente para detectar a recrudescência (Figura 9).

Figura 9- Efeito do tratamento com benznidazol e E1224 na redução do parasitismo tecidual de camundongos BALB/c infectados com cepa Colombiana de *T.cruzi* após a imunossupressão.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Carga parasitária detectada por qPCR logo após o tratamento (16 dias infecção) e após a imunossupressão (20 dias de infecção). E1224- animais tratados com E1224; Cy-E1224- animais imunossuprimidos pós-tratamento com E1224; Bz- animais tratados com benznidazol; Cy-Bz animais imunossuprimidos pós-tratamento com Bz; NT- animais infectados não tratados; ns-não significativo. Painel à esquerda (A,C,D,E,G,I) em escala Log. Painel à direita (B,D,F,H,J) em escala linear.

A Figura 10 mostra os dados de quantificação dos tecidos nos quais foi detectada diferença significativa na carga parasitária resultante de ambos os tratamentos e/ou na presença de imunossupressão.

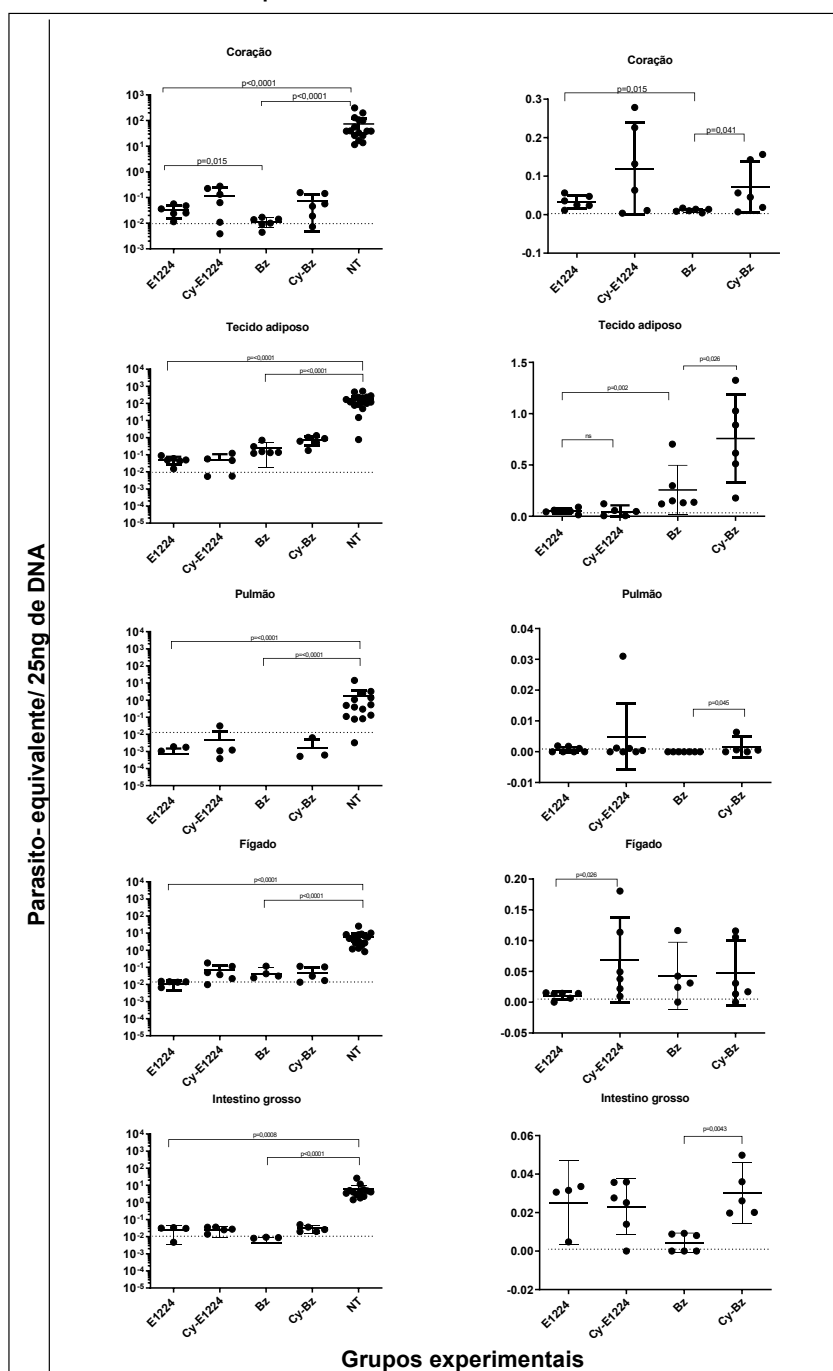
No coração, pulmão, tecido adiposo, fígado e intestino grosso a quantidade de parasitos nos animais tratados foi, novamente, significativamente menor do que o controle não tratado (Figura 10).

No coração, a ação antiparasitária do BZ foi significativamente maior que do E1224 (Figura 10B), a despeito da baixa carga parasitária observada para ambos. Os valores quantificados para os animais tratados com E1224 e BZ, respectivamente, foram 0,033 e 0,011 parasitos equivalentes, enquanto o controle positivo apresentou média de 73,94. De forma interessante, após a imunossupressão, a carga parasitária detectada nos animais tratados com BZ foi maior do que aqueles não imunossuprimidos, sendo similar à dos animais tratados com E1224 (Figura 10B). Já para o E1224, houve uma tendência de aumento da carga parasitária, contudo, não é possível observar diferença daqueles não imunossuprimidos devido à alta variabilidade (Figura 10B).

Os dados mostrados na figura 10 E e F demonstram resultado similar de parasitismo tecidual em pulmão, sendo o parasitismo totalmente suprimido nos animais tratados com BZ. Contudo, após a imunossupressão, baixos níveis foram detectados no pulmão, sendo maiores do que os observados nos animais logo após o tratamento. Para E1224, em apenas um animal foi detectado aumento do parasitismo resultante da imunossupressão.

De forma interessante, a despeito do caráter miotrópico, foi detectado intenso parasitismo da cepa Colombiana no tecido adiposo dos animais não tratados (Figura 10 C). Ambos os fármacos foram eficientes em reduzir o número de parasitos (Figura 10 C e D) ; a média do grupo não tratado foi 173,7 parasitos equivalentes, enquanto a quantidade média para E1224 e Bz foi de 0,050 e 0,256, respectivamente. Esses valores resultam em diferença significativa entre os tratamentos, o que pode sugerir que a atividade do E1224 sobre formas intracelulares do parasito no tecido adiposo é superior à do BZ. Em concordância, após a imunossupressão, os níveis parasitários no tecido adiposo dos animais tratados com BZ foram significativamente aumentados, diferente do observado para o E1224 (Figura 10D).

Figura 10- Impacto do tratamento com benznidazol e E1224 na supressão e recrudescência do parasitismo tecidual de camundongos BALB/c infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi*.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Carga parasitária detectada por qPCR logo após o tratamento (16 dias infecção) e após a imunossupressão (20 dias de infecção). E1224-animais tratados com E1224; Cy-E1224- animais imunossuprimidos pós-tratamento com E1224; Bz- animais tratados com benznidazol; Cy-Bz animais imunossuprimidos pós-tratamento com Bz; NT-animais infectados não tratados; ns-não significativo. Painel à esquerda (A,C,D,E,G,I) em escala Log. Painel à direita (B,D,F,H,J) em escala linear. A linha pontilhada representa o limite de detecção da técnica ( $10^{-2}$ ).

Por outro lado, no fígado, perfil oposto foi identificado. Nesse caso, a carga parasitária dos animais tratados com ambos os fármacos foi similar, mas, com a imunossupressão, o número de parasitos aumentou somente no grupo previamente tratado com E1224 (Figura 10 G e H). Foram identificados 0,010 e 0,068 parasitos equivalentes, pré e pós imunossupressão, respectivamente. Já para os grupos tratados comparados isoladamente ao grupo infectado não-tratado houve uma relevante supressão da carga parasitária (Figura 10G).

Já a quantificação do parasitismo no intestino grosso apresentou médias de parasitos equivalentes baixas nos grupos tratados comparativamente ao grupo NT, cujos níveis médios foram de 5,955 parasitos equivalentes (Figura 10 I). De forma interessante, os animais que receberam BZ e foram imunossuprimidos tiveram a carga parasitária aumentada nesse tecido (0,004 e 0,030 pré- e pós imunossupressão) (Figura 10 J).

Nossos resultados sugerem que o que coração, tecido adiposo, intestino grosso, fígado e pulmão podem servir como reservatórios do parasito e contribuir para o insucesso terapêutico com BZ e/ou E-1224 na fase aguda da infecção experimental pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.

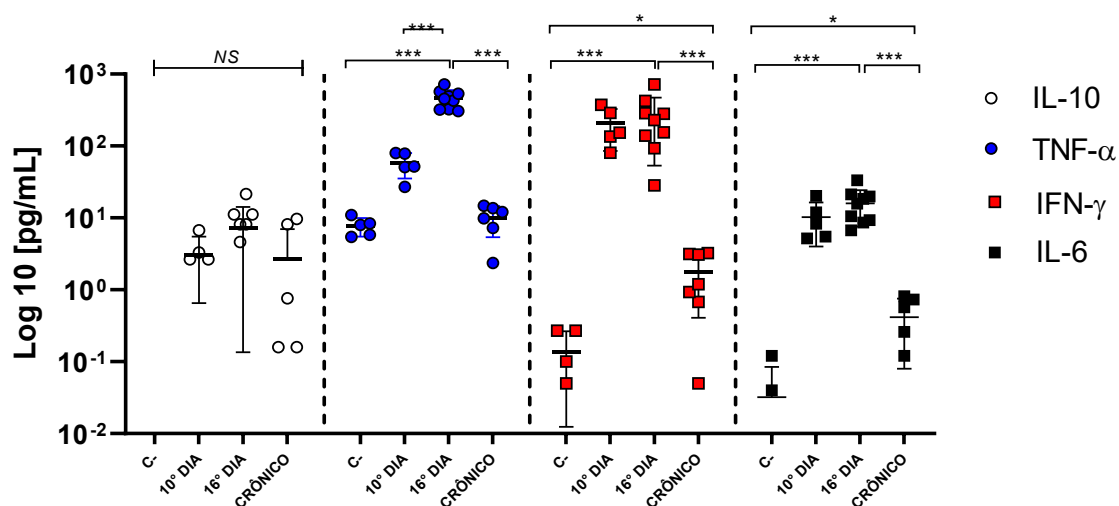
#### **4.1.4 Quantificação de citocinas no plasma de animais infectados com a cepa Colombiana**

A determinação dos níveis de citocinas nos animais infectados pela cepa Colombiana e tratados ou não com BZ e E1224 foi feita em dois períodos –no primeiro e no último dia de tratamento – equivalente ao 10<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dias de infecção. Adicionalmente, para essa análise foram incluídas amostras de animais na fase crônica da infecção (Figura 11). Foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10. Já as citocinas IL-4, IL-2 e IL-17 apresentaram-se em níveis muito reduzidos e de forma similar entre os animais infectados, tratados ou não, e não infectados. Por esse motivo, não estão incluídas nas figuras.

A Figura 11 mostra os níveis de citocinas detectados nos animais infectados, em diferentes tempos de infecção, comparativamente aos não infectados. Os níveis de TNF- $\alpha$  se mostraram elevados em mais de 50 vezes nos animais sem o tratamento (453,8 pg/mL) comparado ao grupo não infectado (7,99 pg/mL); no grupo crônico a média da citocina foi de 10,96 pg/mL, similar aos animais não infectados.

Diferente do que foi observado para o TNF- $\alpha$ , cujos níveis foram gradualmente aumentados na fase aguda, a quantificação de IFN- $\gamma$  foi similar aos 10 e 16 dias de infecção nos animais não tratados, sendo esses valores significativamente aumentados em relação aos detectados nos camundongos não infectados (Figura 11). Enquanto a quantificação média dos animais sem infecção foi de 0,1, o controle infectado apresentou média mil e oitocentas vezes maior (229,4 pg/mL). Por outro lado, esses níveis foram significativamente reduzidos na fase crônica da infecção, com média de 1,190 pg/mL (Figura 11).

Figura 11- Perfil dos níveis de citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 em camundongos BALB/c sem tratamento etiológico durante fase aguda e fase crônica da infecção com cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Quantificação de citocinas em animais infectados com cepa Colombiana de *T.cruzi* sem tratamento ou animais em fase crônica como comparativo dos níveis aos animais de fase aguda. C- - Animais não infectados; 10º DIA – Coleta de sangue no 10º dia de infecção; 16º DIA – Coleta de sangue no 16º dia de infecção; CRÔNICO – Coleta de sangue após 240 dias de infecção.

A citocina IL-6 foi detectada em níveis aumentados em camundongos infectados durante a fase aguda, com baixos níveis na fase crônica (0,415 pg/mL). Com relação à IL-10, os animais infectados apresentaram valores significativamente maiores do que os controles negativos, porém similares entre as diferentes fases da infecção (Figura 11).

#### 4.1.5 Influência do tratamento nos níveis de citocinas em animais infectados com a cepa Colombiana

A quantificação de citocinas dos animais tratados, comparativamente aos controles, foi realizada com amostras coletadas após a última dose de tratamento, o que equivale ao período de 16 dias de infecção.

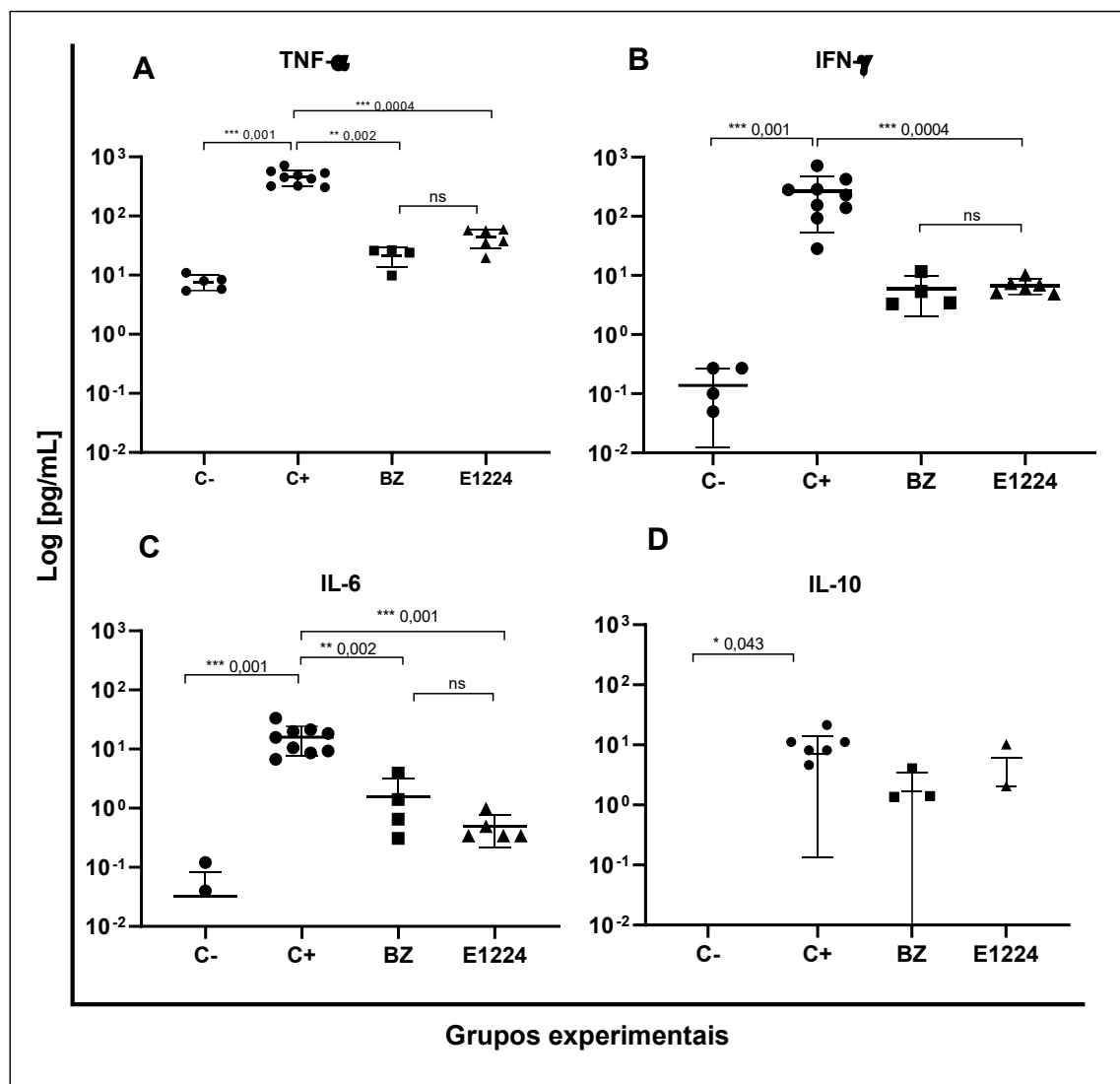
A Figura 12 mostra os níveis de TNF- $\alpha$  detectados nos diferentes grupos. A infecção induziu níveis gradativamente maiores dessa citocina na fase aguda (10<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dia de infecção) (Figura 11). Contudo, ambos os tratamentos, com BZ e E1224, foram eficazes em reduzir significativamente os níveis de TNF- $\alpha$ . Enquanto a média do controle (20 dias de infecção) foi de 453,8 pg/mL, para os tratados com BZ o valor foi cerca de 18 vezes menor (24,93pg/mL) e para E1224 foi, no mesmo período, nove vezes menor (46,97 pg/mL).

Já os níveis da citocina IL-6 mostraram perfil similar ao observado para IFN, com aumento abrupto a partir do 10<sup>o</sup> dia de infecção, sendo reduzidos na fase crônica (Figura 11). O E1224 foi eficaz em reduzir significativamente os níveis de IL-6; com média de 0,340 pg/mL, enquanto 15,73 pg/mL foram detectados como média do controle positivo. O BZ também reduziu de forma importante os níveis de IL-6 em relação ao grupo infectado não tratado de 1,030 pg/mL, mas ainda superior ao observado para os animais não infectados (0,032 pg/mL) (Figura 12C).

Com relação à citocina IL-10, só foram detectadas diferenças em relação à ausência e presença de infecção. Os camundongos infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* apresentaram níveis elevados comparativamente aos animais não infectados. Contudo, os níveis foram similares entre tratados ou não, independente da fase da infecção (Figura 12D). Os níveis nos animais não infectados e tratados com E1224, foram menores que o limite de detecção da técnica.

Nossos dados demonstram produção similar de citocinas em diferentes órgãos de camundongos infectados e tratados com Bz ou E-1224, indicando que o perfil de citocinas não estaria correlacionado a determinado tecido ser considerado reservatório do parasito na falha terapêutica.

Figura 12- Impacto dos tratamentos com BZ e E1224 nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de camundongos infectados experimentalmente com Cepas Colombiana de *T. cruzi*.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Quantificação dos níveis de citocinas em animais infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi*, aos 20 dias de infecção na presença ou não de tratamento com 100 mg/Kg de benznidazol ou 50 mg/Kg de E1224. C- - Animais não infectados; C+ - Animais infectados e não tratados (20 dias de infecção); BZ – Grupo tratado com benznidazol; E1224 – Grupo tratado com E1224 (pró-fármaco do ravuconazol).

## 4.2 CEPA CL Brener

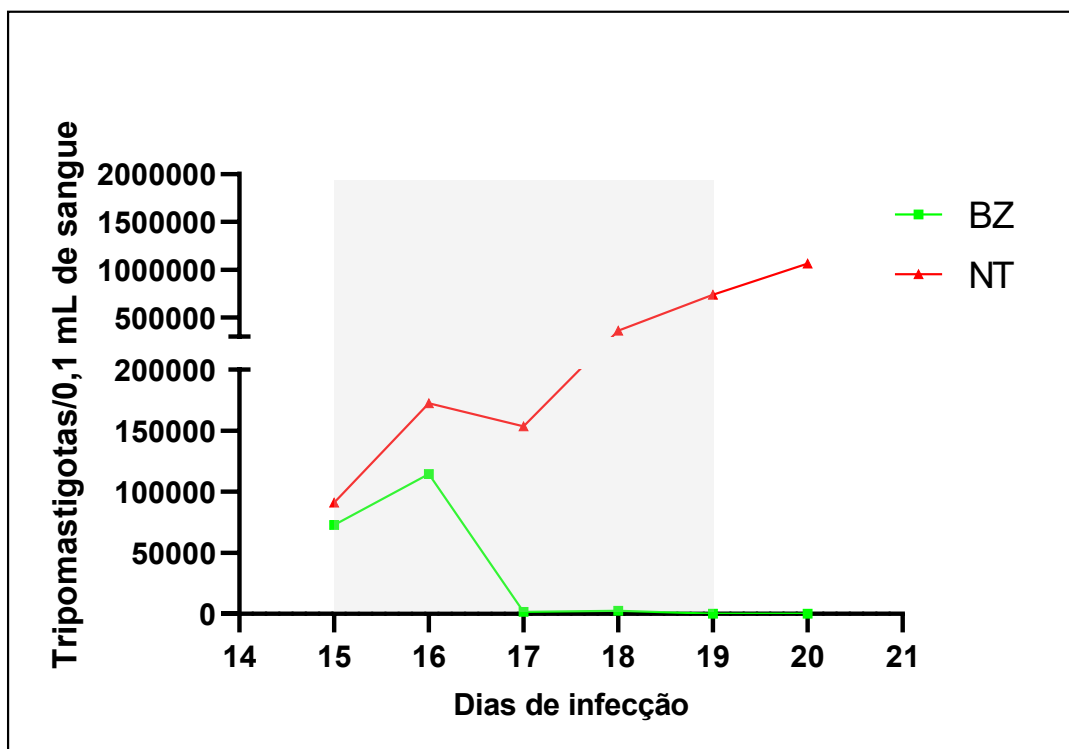
### 4.2.1 Impacto dos fármacos na parasitemia durante e após o tratamento com benznidazol.

Para os experimentos com a cepa CL Brener foi utilizado somente o fármaco

de referência, BZ. Além disso, considerando o caráter de susceptibilidade da cepa, o tratamento foi iniciado no 15º dia de infecção, período no qual a infecção estava bem estabelecida.

A ação antiparasitária do BZ é claramente demonstrada já a partir da administração da segunda dose (Figura 13), com negatização do exame de sangue a fresco para todos os animais. A supressão permaneceu mesmo após a imunossupressão. A média geral da parasitemia nos grupos tratados com BZ foi de 31.944, enquanto para os animais sem tratamento foi de 430.417 parasitos por 0,1mL de sangue. A supressão da parasitemia pelo tratamento com BZ foi semelhante ao encontrado para a cepa Colombiana, com eficácia já a partir do segundo dia de tratamento com a dose referência.

Figura 13- Parasitemia da cepa CL Brener de *T.cruzi* em camundongos BALB/c na ausência ou presença do tratamento com benznidazol 100mg/Kg.



Fonte: Autoria própria

Nota: Parasitemia detectada por exame de sangue a fresco durante seis dias de tratamento, exceto no sexto dia de infecção que não houve administração de fármaco. Infecção com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas, com inóculo de 0,1 mL. NT-infectado e não tratado; BZ- benznidazol 100mg/kg. A área sombreada cinza representa o período de tratamento.

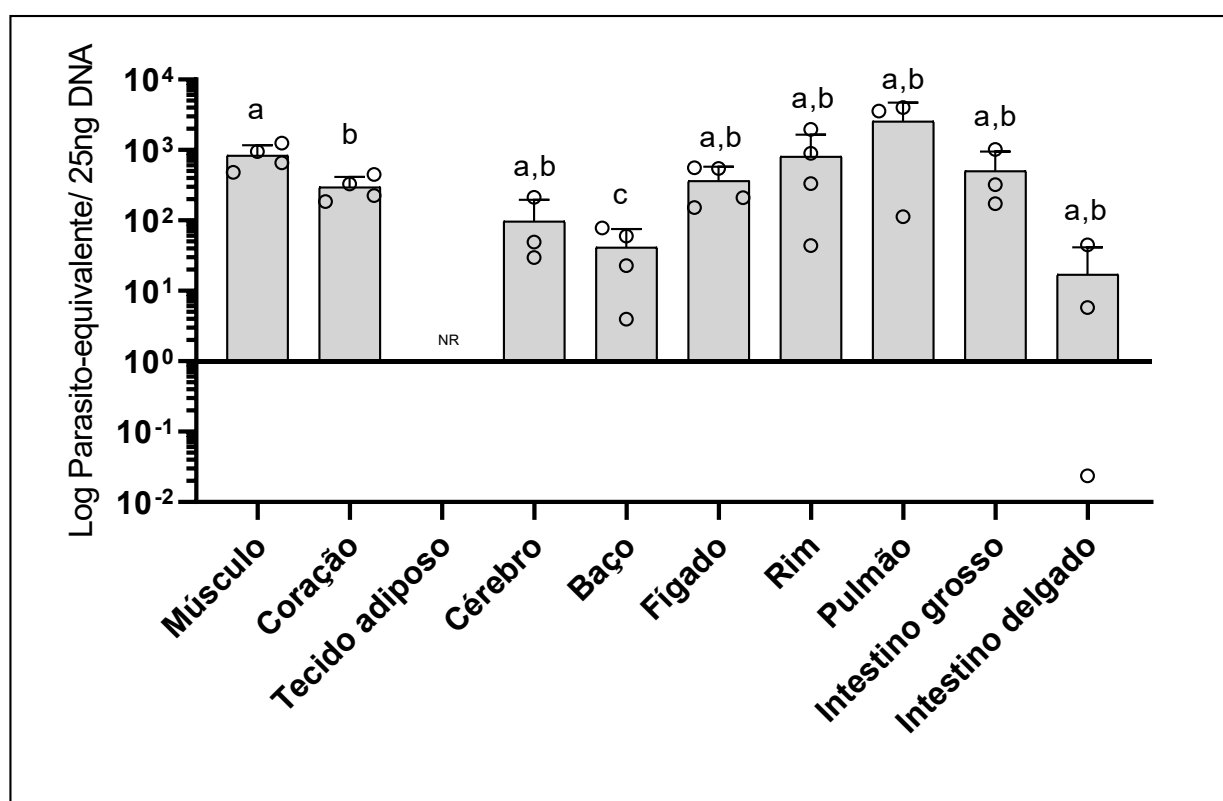
#### 4.2.2 Carga parasitária tecidual da cepa CL Brener por qPCR

A Figura 14 apresenta a carga parasitária em diferentes tecidos aos 20 dias de infecção de camundongos pela cepa CL Brener.

Elevadas quantificações foram encontradas nos órgãos/tecidos pulmão, músculo esquelético; rins; intestino grosso; fígado e coração; com médias variando de mais de 2 mil a 297,3 par-eq/ 25ng DNA (Figura 14). Essas médias, de forma geral, são maiores do que aquelas comparadas à cepa Colombiana, exceto para músculo esquelético, coração.

Níveis menores de parasitismo, comparado aos tecidos já citados, foram detectados no cérebro, baço e intestino delgado, com média de 96,94; 41,35 e 16,99 par-eq/ 25ng DNA (Figura 14). De qualquer forma, esses níveis são superiores aos observados para a cepa Colombiana com o mesmo período de infecção

Figura 14- Distribuição da carga parasitária de *T. cruzi* em camundongos infectados por cepa CL Brener.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Carga parasitária quantificada por PCR em tecidos de animais infectados por cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 20 dias de infecção. NR: não realizado por amostragem insuficiente. Letras iguais indicam similaridade estatística. Valores dados em parasito-equivalente por 25ng/DNA.

### **4.2.3 Influência do tratamento com benznidazol na carga parasitária de animais infectados pela cepa CL Brener**

De forma similar ao observado para os animais infectados pela cepa Colombiana, o tratamento com BZ reduziu significativamente a carga parasitária nos tecidos avaliados (Figuras 15 a 17). Não foi possível detectar redução significativa nos intestinos delgado e grosso, além do tecido adiposo; contudo, o baixo n amostral e variabilidade detectada provavelmente limitaram a análise. Especificamente no tecido adiposo a comparação não foi feita, pois não foi possível coletar dos animais infectados e não tratados.

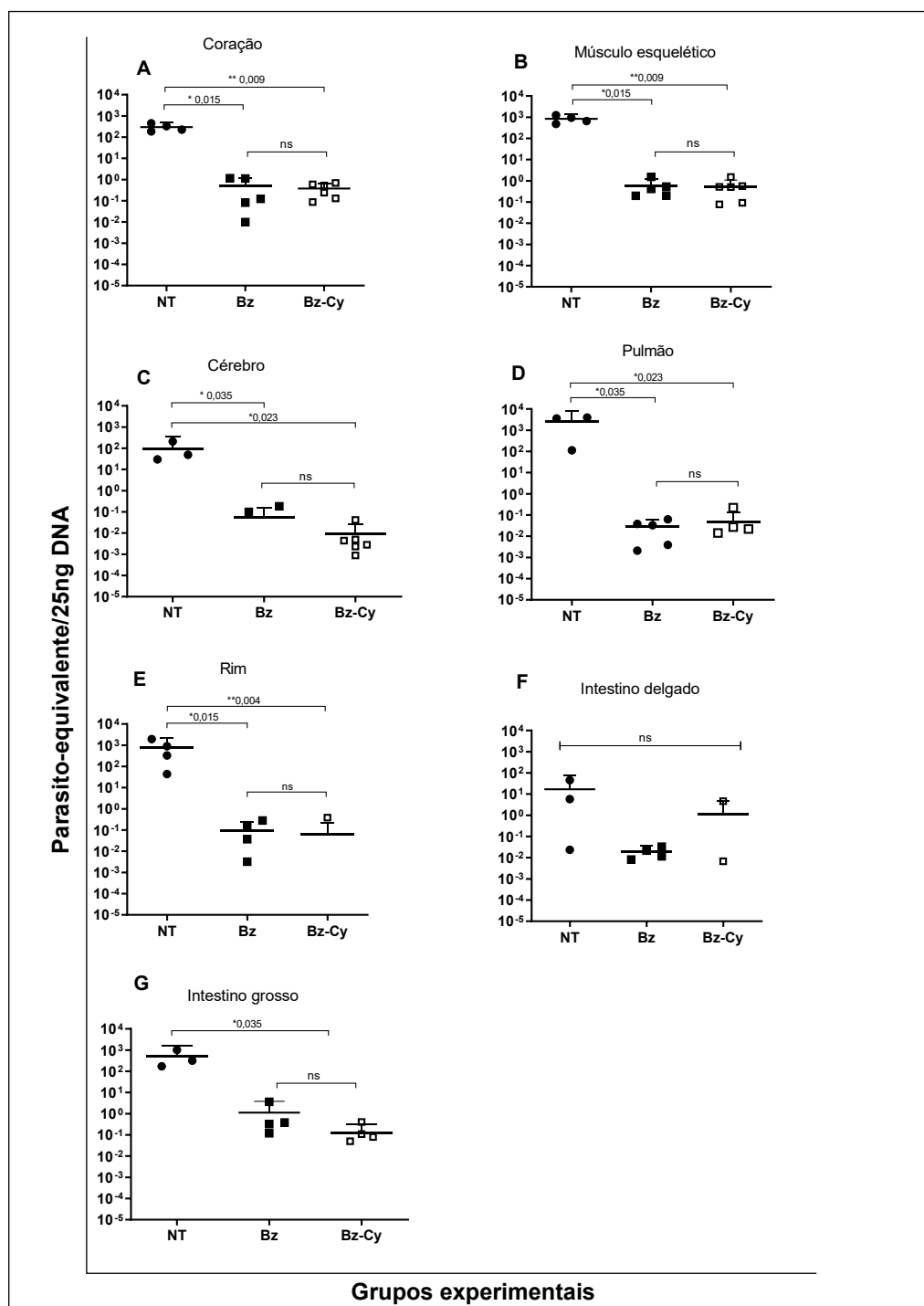
Pode ser observado na Figura 15 que no coração, músculo, cérebro, pulmão, rim e intestino delgado, a imunossupressão pós-tratamento não alterou a carga parasitária em comparação aos animais tratados e não imunossuprimidos (Figura 15 F). Foram detectados, na maior parte desses tecidos – com exceção do cérebro, quantidades superiores ao limite de detecção da técnica, apesar de muito reduzidas em comparação aos controles.

A quantificação em músculo esquelético mostrou-se elevada nos animais sem tratamento, enquanto a média para o grupo BZ foi de 0,577 par/eq e 0,543 no grupo que recebeu 100 mg/Kg de Cy (Figura 15B). De forma interessante, para o pulmão, apesar da elevada carga parasitária no grupo NT, após o tratamento e imunossupressão, as médias caíram para 0,028 e 0,047 par/eq (Figura 15C).

Nos animais que foram tratados, a média de quantificação de parasitos detectada no cérebro (Figura 15D), rim (Figura 15E) e intestino delgado (Figura 15F) foram; 0,051; 0,098 e 0,018 par/eq, respectivamente. Para os mesmos órgãos, considerando os grupos Bz-Cy os valores encontrados foram 0,009 (cérebro); 0,064 (rim), e 0,003 (intestino delgado) par/eq 25ng de DNA.

Já o intestino grosso não apresentou diferenças entre os grupos tratados, mas uma redução relevante foi detectada entre os animais do grupo NT e Bz-Cy, com média do grupo imunossuprimido de 0,129 par/eq (Figura 15G). A média para o grupo que recebeu tratamento BZ foi de 1,100 par/eq (Figura 15H).

Figura 15- Impacto do benznidazol no parasitismo tecidual de animais infectados pela cepa CL Brener na presença e ausência de imunossupressão.

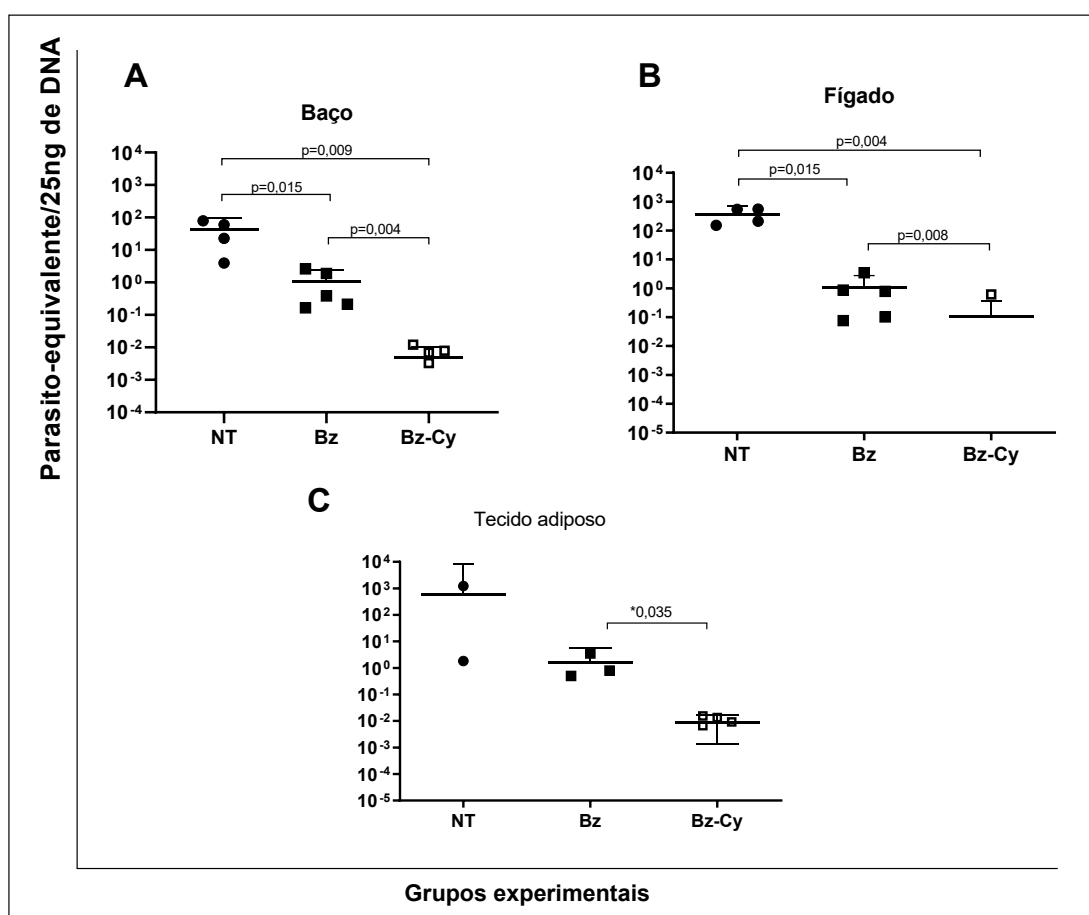


Fonte: Autoria própria.

Nota: Carga parasitária quantificada por PCR em tecidos de animais infectados com cepa CL Brener de *T. cruzi*, tratados com 100 mg/Kg de benznidazol e animais tratados que receberam três doses de 100 mg/Kg de ciclofosfamida. NT- grupo infectado não-tratado; Bz- grupo infectado e tratado com benznidazol; Bz-Cy- grupo de animais infectados e tratados com benznidazol e imunossuprimidos posteriormente com de ciclofosfamida.

Padrão distinto foi encontrado no baço e no fígado; os animais submetidos a infecção por *T. cruzi* que não receberam tratamento apresentaram carga parasitária média de 41,35 e 366,4 par-eq/ 25ng DNA, respectivamente (Figura 16A e B). O fármaco foi capaz de reduzir o parasitismo em ambos os órgãos, mesmo a despeito da alta carga parasitária encontrada, particularmente no fígado. De forma interessante, a quantidade de DNA nos animais imunossuprimidos posteriormente ao tratamento, foi ainda menor do que os tratados e não imunossuprimidos (Figura 16). A quantificação no tecido adiposo também mostrou redução significativa no parasitismo entre os animais tratados e tratados/imunossuprimidos com médias de 1,597 e 0,009 par/eq, respectivamente (Figura 16C).

Figura 16 - Carga parasitária quantificada em baço e fígado de camundongos infectados com a cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados com benznidazol.



Fonte: Autoria própria.

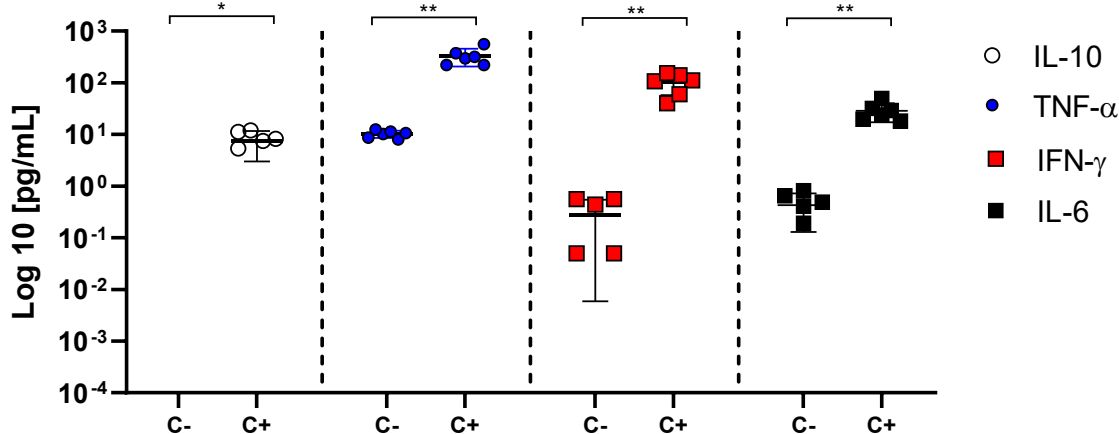
Nota: Carga parasitária quantificada por PCR em tecidos de animais infectados com cepa CL Brener de *T. cruzi*, tratados com 100 mg/Kg de benznidazol e animais tratados que receberam três doses de 100 mg/Kg de ciclofosfamida. NT- grupo infectado não-tratado; Bz- grupo infectado e tratado com benznidazol; Bz-Cy- grupo de animais infectados e tratados com benznidazol e imunossuprimidos posteriormente com de ciclofosfamida.

#### 4.2.4 Quantificação dos níveis de citocina em cepa CL Brener

Os níveis de citocinas foram quantificados no último dia de experimentação; equivalendo a 20 dias de infecção para os controles e grupo tratado com BZ e aos 25 dias para o grupo imunossuprimido pós-tratamento (BZ-Cy). De forma similar ao observado para a cepa Colombiana, as citocinas IL-4, IL-2 e IL-17a apresentaram níveis muito reduzidos para todos os grupos experimentais, por isso não estão representadas graficamente.

Na Figura 17 são mostrados os grupos negativos (sem infecção) e positivo (infectado não tratado). Para IL-10, os níveis detectados nos animais sem infecção foram iguais a zero, enquanto nos infectados a média foi de 7,805 pg/mL. Já os níveis de TNF- $\alpha$  foram aumentados em cerca de 100 vezes na presença de infecção, seguidos do IFN- $\gamma$ , 400 vezes maior, e IL-6 com níveis 50 vezes maiores nos animais infectados comparativamente aos controles. Esses dados mostram a presença de intensa resposta inflamatória na ausência de tratamento (Figura 17).

Figura 17- Perfil dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 em camundongos BALB/c controles não tratados, na ausência e na presença de infecção com a cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Autoria própria.

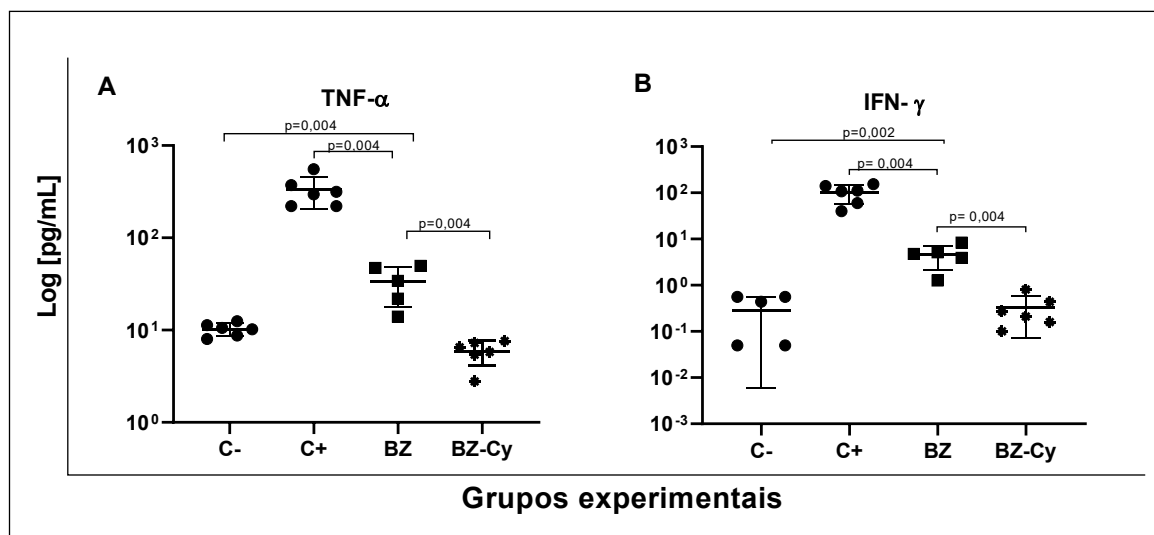
Nota: Os níveis de citocinas foram quantificados aos 25 dias de infecção com cepa CL Brener de *T. cruzi*, sem a presença de tratamento com benznidazol. C- - Animais não infectados; C+ - Animais infectados e não tratados.

A seguir foi investigado o impacto do tratamento com BZ no perfil de citocinas observado na fase aguda da infecção. Neste experimento, para validar o papel imunossupressor da ciclofosfamida – usada para induzir a reativação do parasitismo,

foram ainda quantificadas as citocinas no plasma dos animais imunossuprimidos.

A Figura 18 mostra os valores das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  encontrados nos diferentes grupos. O tratamento com BZ foi eficiente em reduzir em cerca de 100 vezes os níveis de TNF- $\alpha$  (33,39 pg/mL). Já o grupo que recebeu imunossupressor teve a menor média, 5,897 pg/mL. Resultados similares foram observados para a citocina IFN- $\gamma$ ; o grupo controle positivo apresentou média de 109,4 pg/mL de IFN- $\gamma$ , seguida de 4,688 pg/mL no grupo tratado e 0,331 pg/mL nos animais imunossuprimidos.

Figura 18- Impacto do tratamento com Benznidazol sob a quantificação dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em camundongos infectados experimentalmente com cepa CL Brener de *T. cruzi*.



Fonte: Autoria própria

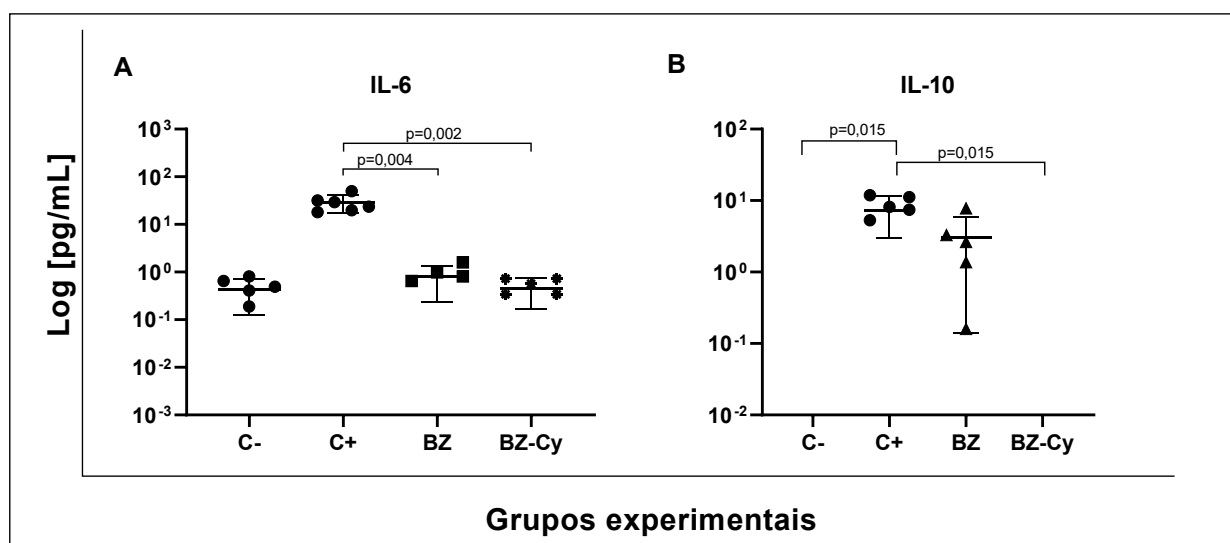
Nota: A- Quantificação de TNF- $\alpha$ . B- Quantificação de IFN- $\gamma$ . C- - Animais não infectados; C+ - Animais infectados e não tratados (20 dias de infecção); BZ – Grupo tratado com benznidazol (20 dias de infecção); BZ-Cy – Animais tratados com benznidazol e imunossuprimidos após o tratamento até o 25º dia de infecção.

A Figura 19 mostra os níveis das citocinas IL-6 e IL-10. A primeira mostrou um perfil similar às demais citocinas avaliadas, com aumento resultante da infecção e redução resultante do tratamento. Contudo, o BZ levou a redução a níveis similares aos animais não infectados e tratados imunossuprimidos. Considerando o perfil de susceptibilidade já determinado para essa cepa, esses dados podem apontar um possível papel da IL-6 como indicador precoce de resposta terapêutica (Figura 23A).

Já a citocina anti-inflamatória IL-10 foi significativamente aumentada em resposta à infecção (Figura 19B) e, o tratamento com BZ não impactou em redução

da média observada nos animais infectados; apenas 1 animal apresentou valor redução, sendo a média do grupo tratado similar ao infectado e não tratado. Já no grupo não infectado; e infectado tratado e imunossuprimido, os níveis ficaram abaixo do limiar de detecção do método (Figura 19B).

Figura 19- Impacto do tratamento com benznidazol sob a quantificação dos níveis de citocinas IL-10 e IL-6 em camundongos infectados experimentalmente com cepa CL Brener de *T.cruzi* após o tratamento.



Fonte: Autoria própria

Nota: A- Quantificação de IL-6. B- Quantificação de IL-10. C- - Animais não infectados; C+ - Animais infectados e não tratados (20 dias de infecção); BZ – Grupo tratado com benznidazol (20 dias de infecção); BZ-Cy – Animais tratados com benznidazol e imunossuprimidos após o tratamento até o 25º dia de infecção.

Nossos dados demonstram produção similar de citocinas em diferentes órgãos de camundongos infectados pelas cepas Colombiana e CL de *T. cruzi* e tratados com Bz e/ou E-1224, indicando que o perfil de citocinas não estaria correlacionado a determinado tecido ser considerado reservatório do parasito na falha terapêutica.

Os dados obtidos para distribuição tecidual e níveis de citocinas para ambas as cepas são sumarizados nas tabelas 1 a 4, as quais apresentam as médias simples das quantificações de cada grupo.

As curvas de eficiência de amplificação e curva de melting aplicadas nas leituras de PCR são apresentadas no anexo A.

Tabela 1- Comparação de biodistribuição das cepas Colombiana e CL Brener de *T. cruzi* em fase aguda, em camundongos BALB/c aos 20 e 25 dias de infecção, respectivamente.

<b>Tecido</b>	<b>Colombiana</b>	<b>CL Brener</b>
Músculo esquelético	332,5	832,9
Coração	150,2	297,3
Tecido adiposo	136,1	NR
Cérebro	0,49	96,94
Baço	1,67	41,35
Fígado	2,37	366,4
Rim	2,25	805,8
Pulmão	13,18	2561,62
Intestino grosso	7,85	501,6
Intestino delgado	0,72	16,99

Fonte: Autoria própria.

Nota: Valores representados em média de parasito- equivalente em 25ng de DNA, em tecidos de animais infectados com cepa Colombiana ou CL Brener de *T. cruzi*, quantificados por PCR. NR- não realizado.

Tabela 2- Impacto do tratamento etiológico com benznidazol e E1224 na biodistribuição da cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos BALB/c.

<b>Cepa Colombiana (fase aguda)</b>				
<b>Tecido</b>				
	<b>BZ</b>	<b>Bz-Cy</b>	<b>E1224</b>	<b>E1224-Cy</b>
Músculo esquelético	0,377	0,475	0,232	3,961
Coração	0,0118	0,071	0,033	0,119
Tecido adiposo	0,256	0,757	0,050	0,047
Cérebro	0,012	0,007	0,009	0,0068
Baço	0,006	0,010	0,001	0,004
Fígado	0,042	0,047	0,010	0,068
Rim	0,0002	0,0007	0,0004	0,0001
Pulmão	0	0,001	0,0006	0,004
Intestino grosso	0,004	0,030	0,025	0,023
Intestino delgado	0,004	0,008	0,003	0,005

Fonte: Autoria própria.

Nota: Valores representados em média de parasito- equivalente em 25ng de DNA em tecidos de animais infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi*, quantificados por PCR. Quantificações de tecidos de animais tratados com benznidazol e imunossuprimidos posteriormente, assim como os animais tratados com E1224. Números em vermelho representam valores inferiores ao limite inferior de detecção da PCR.

Tabela 3- Impacto do tratamento etiológico com benznidazol na biodistribuição da cepa CL Brener de *T. cruzi* em camundongos BALB/c.

Tecido	CL Brener	
	BZ	Bz-Cy
Músculo esquelético	0,577	0,543
Coração	0,501	0,383
Tecido adiposo	1,597	0,009
Cérebro	0,051	0,009
Baço	1,051	0,005
Fígado	1,053	0,102
Rim	0,098	0,064
Pulmão	0,028	0,047
Intestino grosso	1,100	0,129
Intestino delgado	0,018	0,003

Fonte: Autoria própria.

Nota: Valores representados em média de parasito- equivalente em 25ng de DNA. Números em vermelho representam valores inferiores ao limite inferior de detecção da PCR. BZ- Animais infectados tratados com benznidazol; Bz-Cy- animais infectados e tratados com benznidazol, imunossuprimidos após 5 dias de tratamento.

Tabela 4- Impacto da infecção e do tratamento etiológico no perfil de citocinas da fase aguda da infecção de camundongos BALB/c pelas cepas Colombiana e CL Brener de *T. cruzi*.

<b>Cepa Colombiana</b>				
<b>Citocina</b>				
	<b>C+</b>	<b>BZ</b>	<b>E1224</b>	<b>Crônico</b>
TNF- $\alpha$	453,8	24,93	46,97	10,96
IFN- $\gamma$	229,4	4,385	6,410	1,190
IL-10	8,170	1,385	0	0,160
IL-6	15,73	1,030	0,340	0,415

<b>Cepa CL Brener</b>				
<b>Citocina</b>				
	<b>C+</b>	<b>BZ</b>	<b>E1224</b>	<b>Crônico</b>
TNF- $\alpha$	306,1	33,39	-	-
IFN- $\gamma$	109,4	4,688	-	-
IL-10	7,805	3,048	-	-
IL-6	26,45	0,806	-	-

Fonte: Autoria própria.

Nota: Valores representados em média de picograma por mL (pg/mL). C+- animais infectados e não tratados; BZ- grupos de animais infectados e tratados com benznidazol; E1224- Grupo de animais infectados e tratados com pró-fármaco do ravuconazol (E1224); Crônico- Animais com 240 dias de infecção. Para a cepa CL Brener não há resultados para tratamento com E1224 e grupo crônico.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, mapeamos a biodistribuição, na ausência e presença de tratamento, de duas cepas de *T. cruzi* bem caracterizadas, com perfis opostos de susceptibilidade ao benznidazol – Colombiana e CL Brener, na expectativa de identificar diferenças, relacionadas à distribuição tecidual em camundongos BALB/c e resposta imune associada, que auxiliem na compreensão da resistência ou susceptibilidade “naturais” dessas cepas aos fármacos. Nossos resultados indicaram que o coração, músculo esquelético e tecido adiposo são importantes nichos da cepa Colombiana durante a fase aguda da infecção murina, enquanto a cepa CL apresenta distribuição tecidual mais ampla e com altas cargas parasitárias. O benznidazol foi eficiente em reduzir dramaticamente a carga parasitária dos animais, independente do perfil de resistência da cepa. E, de forma interessante, o efeito supressor do parasitismo exercido pelo E1224 sobre a cepa Colombiana, multidroga-resistente, foi similar ao benznidazol. Contudo, identificamos diferentes padrões de reativação do parasitismo após o tratamento, os quais foram dependentes do tecido, cepa e fármacos. De forma diferente, não foram encontradas diferenças relevantes entre o perfil de citocinas resultante da cepa utilizada para infecção ou tratamento utilizado. É importante ressaltar que, embora a grande questão clínica seja a resistência da infecção crônica ao tratamento, no contexto experimental, as cepas resistentes manifestam esse fenótipo ainda na fase aguda (Filardi e Brener, 1987), sendo, portanto, usadas para evolução de candidatos no *screening* pré-clínico (Soeiro *et al.*, 2024).

Muito conhecimento foi acumulado nos últimos anos sobre biologia de *T. cruzi*, novas moléculas e estratégia farmacológicas candidatas ao tratamento da infecção por *T. cruzi* (Gabaldón *et al.*, 2023), culminando com a avaliação clínica dos candidatos mais promissores. Apesar de a realização desses estudos robustos ser considerada um avanço na área, a falha terapêutica observada em todos os estudos (Molina, 2014; Pinazo *et al.* 2024; Torrico *et al.*, 2018) reacendeu discussões mais aprofundadas sobre os motivos pelos quais o parasito resiste ao tratamento com fármacos que apresentam diferentes mecanismos de ação (Soeiro *et al.*, 2024). De forma similar ao que é observado para o tratamento de referência com BZ, todos os candidatos apresentaram no contexto clínico ação supressiva do parasitismo, reduzindo drasticamente a parasitemia durante o tratamento, mas de forma não

sustentada, resultando em reativação pós-tratamento (Molina, 2014; Pinazo *et al.* 2024; Torrico *et al.*, 2018).

Os dados obtidos mostraram que com 16 dias de infecção a carga parasitária quantificada no coração e músculo esquelético dos animais infectados pela cepa Colombiana foi significativamente maior comparada aos demais tecidos analisados. Contudo, identificamos ainda intenso parasitismo no tecido adiposo, similar ao observado nos tecidos musculares, no início da fase aguda. Todavia, o aumento expressivo da carga parasitária (do 16º para o 20º dia de infecção) detectado no coração e músculo esquelético, não foi identificado no tecido adiposo. Pode ser sugerido, resguardadas as limitações de detecção da técnica e período avaliado, que há uma dinâmica distinta de parasitismo dos órgãos ao longo das primeiras semanas de infecção. Considerando o aumento da parasitemia que ocorre no mesmo período, pode ser sugerido que, apesar da ampla distribuição do parasito em diversos tecidos, coração e músculo esquelético seriam “fontes” de formas tripomastigotas muito mais eficientes que o tecido adiposo.

A cepa Colombiana apresenta características biológicas – infectividade, patogenicidade em hospedeiros vertebrados, padrão de desenvolvimento em cultivo *in vitro* e nos triatomíneos, e perfil de resistência a fármacos muito bem estabelecido na literatura, sendo bastante utilizada para estudos de cardiopatia experimental na DC (Carmo Neto *et al.*, 2022). Essa cepa, altamente resistente ao BZ, apresenta miotropismo, principalmente cardíaco e esquelético (Andrade *et al.*, 1986; Machado *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). Ainda, tem a capacidade de infectar e induzir lesão em outros órgãos, incluindo o trato gastrointestinal, pulmões e tecido adiposo (Carmo Neto *et al.*, 2022; Silberstein *et al.*, 2018).

Os dados de carga parasitária intestinal estão alinhados com a literatura, já que tropismo intestinal pela cepa Colombiana é relatado com menor frequência (Wesley *et al.*, 2019), e, geralmente associado ao cólon (Silberstein *et al.*, 2018). Ainda, um estudo experimental recente mostrou que essa cepa induz a destruição neuronal e deposição de colágeno durante a fase aguda, mostrando que o intestino pode ser um bom modelo da DC experimental (Carmo Neto *et al.*, 2022). Em nosso trabalho, apesar de a quantidade de parasito equivalente ser baixa comparativamente ao coração, foi possível observar que no intestino grosso existe maior parasitismo comparado com intestino delgado, inclusive quando comparamos 16 dias pós infecção com 20 dias.

Estudos anteriores de histotropismo usando técnicas histopatológicas

mostraram que a partir de 14 dias de infecção com cepa Colombiana o parasitismo no músculo esquelético e coração estão evidentes (Andrade, 1970a; Andrade *et al.*, 1974), com parasitismo intenso nesses mesmos tecidos de 20 a 30 dias pós infecção (Camandaroba *et al.*, 2006). Destacam-se ainda a presença de ninhos de amastigotas em macrófagos, adipócitos e musculatura lisa do intestino (Camandaroba *et al.*, 2006) juntamente com infiltrado inflamatório intenso (Machado *et al.*, 2014), particularmente a partir de 30 dias de infecção (Andrade *et al.*, 1974).

Mais recentemente, Gonçalves e colaboradores (2022) demonstraram que diferentes modulações na taxa de mortalidade, parasitismo e distribuição tecidual da cepa Colombiana em camundongos BALB/c estão relacionadas à via de infecção e origem da forma tripomastigota (Gonçalves *et al.*, 2022). Neste estudo, usando PCR quantitativa aos 15 e 30 dias de infecção, os autores demonstraram tropismo por células musculares resultante da infecção por formas tripomastigotas sanguíneas, enquanto o parasitismo foi amplamente distribuído por outros tecidos quando a infecção foi feita com formas metacíclicas. Contudo, não foi analisada a carga parasitária no tecido adiposo. Em 2021, de Sousa e colaboradores (2021), usando PCR quantitativa, demonstraram a presença de DNA da cepa Colombiana de *T. cruzi* no tecido adiposo de camundongos C57Bl/6, particularmente na presença de dieta rica em lípidos (Sousa *et al.*, 2021). Não foram estudados, porém, outros tecidos. Silberstein *et al.* (2018) modificaram geneticamente a cepa Colombiana para expressar nanoluciferase e avaliaram, por sistema de imagem *in vivo*, a distribuição tecidual em camundongos Swiss. Os autores identificaram os parasitos predominantemente distribuídos na cavidade abdominal, a partir do 7º dia pós-infecção e com picos entre os dias 14 e 21 pós-infecção. Já aos 126 dias pós-infecção, o parasito foi detectado em maior quantidade no coração, músculo esquelético, pulmão, fígado, tecido adiposo mesentérico e intestino, sendo esse resultado similar ao obtido com utilização da PCR quantitativa (Silberstein *et al.*, 2018).

Diante do exposto, é perceptível que a heterogeneidade de modelos e protocolos utilizados dificulta o estabelecimento de um consenso acerca da distribuição tecidual do parasito. Além disso, o impacto do tratamento etiológico nessa distribuição tem sido pouquíssimo explorado. Essa é uma questão paradoxal, já que a cepa Colombiana é amplamente utilizada nos experimentos de avaliação de novos candidatos a fármacos, sendo resistente a moléculas com diferentes mecanismos de ação, incluindo azóis (Diniz *et al.*, 2018; Urbina *et al.*, 2003).

O impacto do tratamento etiológico na distribuição tecidual do parasito em modelos pré-clínicos da doença de Chagas permanece fragmentado. Interferem na capacidade de compreender essa distribuição dois fatores principais; um deles é a alta heterogeneidade de possíveis modelos experimentais, incluindo as cepas do parasito e linhagens de camundongos utilizadas, tamanhos do inóculo e tempos de infecção avaliados. Outro fator de grande relevância são os métodos para avaliação da carga parasitária nos tecidos – histopatologia, detecção de ácidos nucleicos ou imagem *in vivo*, que apresentam sensibilidade e limitações distintas (Gabaldón *et al.*, 2023).

Porém, é curioso que diferentes desfechos podem ocorrer a depender do dia de início do tratamento ou outras variações no esquema terapêutico. Um estudo anterior mostrou que quando administrada uma combinação de Bz e E1224 no 4º dia após a infecção (período de parasitemia subpatente), 100% dos animais foram curados. Quando o mesmo tratamento foi administrado aos 10 dias de infecção, 100% de falha foi detectada (Diniz *et al.*, 2018). Bustamante e colaboradores (2020), usando altas doses de BZ em períodos alternados também eliminou o parasitismo pela mesma cepa, inclusive formas dormentes. Os parasitos dormentes resistem a prolongados períodos na presença de Bz (mais de 30 dias) e dão continuidade ao ciclo a partir de então, em modelos *in vitro* e murino (Sanchez-Valdez *et al.*, 2018).

Os mecanismos pelos quais o processo de dormência se desenvolve ainda não são conhecidos; diferentes cepas do parasito apresentaram essa capacidade, no entanto, não foi investigada a influência do tecido hospedeiro no processo. Nesse sentido, é essencial investigar, para cepas susceptíveis e resistentes à terapia, a existência e localização das formas dormentes. Em nosso trabalho, não é possível fazer essa distinção, entre formas replicantes ou dormentes, contudo, considerando a alta sensibilidade da PCR e o modelo de tratamento utilizado, é possível observar mínimas flutuações na concentração de parasitos, que podem indicar locais de maior resistência aos fármacos.

De acordo com os tipos de tecido adiposo é possível pensar o papel desse tecido no metabolismo do hospedeiro e conseqüentemente na sua importância frente a infecção. O tecido adiposo branco (WAT) é responsável pelo armazenamento de energia em forma de triglicerídeos, pode ser encontrado sob a pele e em torno dos órgãos, atuando como um órgão endócrino que regula o metabolismo (Dilworth, Facey e Omoruyi, 2021; Schöttl, Fischer e Ussar, 2018; Kahn *et al.*, 2019). Já o tecido

adiposo marrom (BAT) é especializado em termogênese, abundante em recém-nascidos, rico em mitocôndrias, sendo associado a benefícios metabólicos (Schöttl, Fischer e Ussar, 2018; Wibmer *et al.*, 2021).

O tecido adiposo bege (Beige) está localizado dentro de depósitos de WAT e possui características intermediárias entre o WAT e BAT, com potencial termogênico e função protetora contra distúrbios metabólicos (Dilworth, Facey e Omoruyi, 2021; Schöttl, Fischer e Ussar, 2018). Por fim o tecido adiposo da medula óssea (BMAT) representando 10% da massa adiposa total, com funções metabólicas distintas (Suchacki *et al.*, 2020); e tecido adiposo intermuscular (IMAT), presente entre os músculos associado à resistência à insulina e alterações metabólicas, como diabetes tipo 2 (Goodpaster *et al.*, 2022). Ou seja, cada tipo de tecido adiposo apresenta um impacto distinto na saúde metabólica.

De grande destaque foi o achado de alta carga parasitária no tecido adiposo branco dos animais em nosso estudo. Apenas nos últimos 20 anos que o papel do tecido adiposo na infecção por *T. cruzi* tem sido explorado mostrando que o parasito pode persistir no tecido adiposo por décadas, atuando como um reservatório de infecção. Estudos demonstraram a presença do parasito em adipócitos primários cultivados *in vitro* e em tecido adiposo de pacientes com doença de Chagas crônica, sugerindo que o tecido adiposo pode ser um local de persistência a longo prazo do parasito (Combs *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011; Tanowitz *et al.*, 2017). O parasitismo dos adipócitos pode ainda influenciar a patogênese e as manifestações clínicas da doença de Chagas, atuando como reservatório favorável a recrudescência (Nagajyothi *et al.*, 2012b; Tanowitz *et al.*, 2017). Um estudo recente mostrou que essa interação pode impactar, no contexto *in vitro*, a eficácia do tratamento (Moreira *et al.*, 2024).

Estudo de Nagajyoythi e colaboradores (2012a) mostraram em modelo murino que com 15 dias de infecção pela cepa Brasil de *T. cruzi* a carga parasitária do tecido adiposo era maior do que na maioria dos outros órgãos, como coração e baço, além de estarem presentes tanto no tecido branco como no marrom. A infecção nesse tecido altera várias vias importantes desde o início na fase aguda até a fase crônica, contribuindo para que os adipócitos sejam alvo da infecção (Nagajyothi *et al.*, 2012b). A persistência do parasito no tecido adiposo já foi constatada em pacientes chagásicos crônicos (Ferreira *et al.*, 2011).

De forma interessante, nossos dados mostraram que, apesar de o E1224 ter ação mais lenta sobre o parasito, provavelmente em função do mecanismo de ação e

atividade predominante sobre amastigotas, ele foi altamente efetivo – de forma similar ao BZ, durante o tratamento. Contudo, logo após o tratamento já foi detectada reativação da parasitemia em 2 animais. Em nível tecidual, nesse mesmo momento, foi detectada ligeira elevação do parasitismo no coração e músculo para o E1224, e no coração e tecido adiposo para o BZ. Esses dados podem indicar que a recrudescência ocorra inicialmente nesses tecidos. É curioso notar que, no tecido adiposo, não foi observada nenhuma alteração de carga parasitária após suspender o tratamento com E1224. Considerando o mecanismo de ação e a hidrofobicidade do ravuconazol (molécula ativa do E1224) e a riqueza de colesterol do tecido adiposo, esse dado merece ser mais bem explorado em experimentos subsequentes.

Recente estudo revelou como as formas intracelulares amastigotas usam o colesterol do hospedeiro para sua sobrevivência; elas podem consumir o colesterol de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi para o seu desenvolvimento. Este trabalho mostrou em 4h de interação já existe a internalização de partículas de LDL por endocitose nos lisossomos parasitados, após 24h de interação essas partículas se estendem ao retículo endoplasmático (Alcantara *et al.*, 2024), confirmando o tráfego clássico do colesterol LDL em células de mamíferos (Ikonen e Olkkonen, 2023). Esses dados destacam a necessidade de intervenções terapêuticas direcionadas.

Contudo, são escassos ou ausentes os trabalhos que exploram a carga parasitária e acesso de fármacos ao tecido adiposo na DC em modelos murinos. Porém, partindo do princípio de que muitos dos medicamentos são hidrofílicos, a persistência do parasito pode prejudicar a eficiência do tratamento (Tanowitz *et al.*, 2017). Um dos poucos dados sobre a ação do BZ em cultura de adipócitos mostrou que o fármaco na concentração de 1ug/mL não foi capaz de diminuir a infecção por *T. cruzi* (Silva *et al.*, 2024). É necessário, portanto, expandir os estudos que abordam essa instigante interação entre o tecido adiposo, permanência do parasitismo e atividade farmacológica. Essas fronteiras já estão sendo exploradas nos estudos de outros patógenos. Na quimioterapia contra a tuberculose, por exemplo, são usados modelos que induzem estados de refratariedade aos fármacos, como meios ricos em lipídeos e/ou substâncias que induzem dormência na bactéria, apresentando maior valor preditivo (Larkins-Ford *et al.*, 2022).

Ressaltamos que o BZ e o E1224 foram capazes de reduzir o parasitismo na fase aguda da doença, considerando a infecção por uma cepa resistente a

quimioterapia. Apesar da baixa da carga parasitária após o tratamento nesses tecidos é possível que eles atuem como uma fonte de reativação da infecção, principalmente nos tecidos musculares e adipócitos.

Ao abordar as características biológicas da cepa clone CL Brener de *T. cruzi*, destacam-se – parasitismo miotrópico preferencial; possui fase aguda em humanos bem definida e altamente susceptível ao tratamento com Bz e NFX (Filardi e Brener, 1987). Essa cepa possui extensa heterogeneidade genética, devido sua origem híbrida de dois genótipos (*T. cruzi* I e II) (Tran *et al.*, 2005; Sodré *et al.*, 2009). Ainda, apresenta tropismo tecidual dinâmico infectando principalmente coração, músculo esquelético e reto (Franco *et al.*, 2003). A cepa CL Brener é um modelo bastante usado em ensaios *in vitro* e *in vivo*, para estudos de infecção, resposta imune, triagem de fármacos e biologia molecular do *T. cruzi*, devido à sua alta virulência e estabilidade genética (Oliveira *et al.*, 2020).

Resultados encontrados mostraram um panorama de parasitismo dinâmico e intenso em todos os órgãos, exceto para intestino delgado que obteve menor média de 16,99 par/eq. Juntamente com esses dados, foi possível representar a supressão do parasitismo pelo tratamento com BZ, chegando a níveis menores que um parasito em 25ng de DNA tecidual. Esse panorama se estendeu aos animais que foram imunossuprimidos, confirmando a susceptibilidade da cepa CL Brener ao fármaco. Apesar do miotropismo da cepa CL Brener, outros tecidos apresentaram alta carga parasitária, confirmando a paninfectividade já relatada desse parasito (Lenzi *et al.*, 1996; Zingales *et al.*, 1997).

Descrito em um estudo com tecnologia de cultura 3D, pesquisadores investigaram a transmigração de formas evolutivas tripomastigotas *in vitro*, para entender a dinâmica da disseminação do parasitismo de *T. cruzi* (Rodriguez *et al.*, 2020). Cepas virulentas como a CL Brener foram altamente invasivas, sugerindo um caminho específico de migração, ao contrário de cepa pouco virulentas, assim demonstraram que cada cepa apresenta um padrão de migração característico podendo ser associado com o seu comportamento em experimentação animal (Rodriguez *et al.*, 2020).

Para tentar explicar a virulência de cepas de diferentes DTUs, estudo *in vitro* analisou a mobilidade e eliminação de componentes ligantes da superfície celular de tripomastigotas na presença de poli-L-lisina, ferritina cationizada e concanavalina A; mostrando que na presença dessas marcações a cepa CL Brener não obteve

interferência no seu crescimento comparada com outras cepas, confirmando que apenas um ligante pode modificar a superfície celular do parasito, o que resulta em respostas variáveis e reconhecimento do sistema imune (Neves *et al.*, 2019).

Resende e colaboradores (2020), observaram a taxa de replicação de distintas cepas; no qual a cepa CL Brener apresentou taxa de replicação menor em relação à cepa Y (considerada parcialmente susceptível ao tratamento). No entanto, a cepa CL produziu maior quantidade de amastigotas dormentes (Sanchez-Valdez *et al.*, 2018), em comparação a cepa parcialmente susceptível, que revela uma correlação negativa entre a dormência e infectividade, que desempenham papel fundamental na distribuição do parasitismo em camundongos, de acordo com diferentes cepas (Resende *et al.*, 2020).

A distribuição tecidual da cepa clone CL Brener expressando luciferase foi investigada com apoio de técnicas de imagem *ex vivo* e microscopia confocal; os autores mostraram que o cólon e miócitos da musculatura lisa são o tipo celular infectado mais comum na infecção aguda; já na fase crônica esses tecidos concentram ninhos de parasitos que funcionam como sítio de persistência do parasitismo, principalmente em células musculares (Ward *et al.*, 2020; Francisco *et al.*, 2016). Nossos dados em músculo esquelético e intestino grosso vão de encontro com a distribuição descrita, onde a carga parasitária quantificada nesses tecidos foram elevadas nos animais infectados sem o tratamento, e após o tratamento com BZ para o intestino a carga se manteve acima de um parasito par/eq em 25ng DNA. De forma interessante, a pele foi descrita como um importante reservatório de *T. cruzi* em modelos experimentais crônicos e em pacientes (Ward *et al.*, 2020), mas este tecido não foi investigado nesse trabalho.

Ainda, dados gerados a partir de técnicas mais robustas de detecção e quantificação de carga parasitária, como as citadas, melhoram o entendimento da interação patógeno-hospedeiro. Utilizando cepa CL Brener, uma pesquisa *in vitro* de Costa e colaboradores (2018), através de epimastigotas da cepa, geraram uma cepa repórter de *T. cruzi*, que permite por ensaios de bioluminescência acompanhar a cinética de infecção e associada à técnica de CRISPR/Cas9 facilita a edição/geração rápida de mutantes do genoma usando uma abordagem baseada em PCR que não requer clonagem de DNA (Costa *et al.*, 2018).

Todo esse cenário reforça a necessidade de conhecer melhor a biodistribuição de cepas com perfis de resistência/susceptibilidade distintos, assim

como a farmacocinética dos fármacos estudados, em busca de compreender se há relação na biodistribuição farmacológica com a distribuição e/ou redução do parasitismo em determinados órgãos.

Em relação a resposta imune durante a patogênese da doença, é extremamente importante para o entendimento das alterações morfofisiológicas que ocorrem em órgãos acometidos pela infecção por *T. cruzi*, ela pode modular uma resposta inflamatória contra o parasito. Em animais infectados com *T. cruzi* há uma tentativa do hospedeiro de controlar a inflamação ocasionada por intensa ativação imunológica, além de sugerir um mecanismo de evasão do parasito para suprimir a resposta efetora do organismo infectado (Vellozo, Matos-Silva e Lopes, 2023). Níveis elevados de IL-10 indicam regulação da resposta imune limitando a produção de IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  e IL-12, além de reduzir a ativação de macrófagos consequentemente aumentando a susceptibilidade ao parasito (Wei, Wang e Li, 2020).

Como foi observado neste trabalho, os níveis de IL-10 se mantiveram maiores tanto nos infectados por cepa Colombiana, quanto cepa CL Brener. Os níveis de IL-10 dos animais tratados imunossuprimidos e infectados com a cepa CL Brener foram os menores na análise individual por cepa, com aumento quando havia infecção.

Estudo *in vitro* com as cepas CL Brener e CL-14 (clone menos virulento), analisaram após infecção, as alterações na expressão de genes na infecção de células HFF e confirmaram a diferença na sinalização de citocinas relacionadas com a ativação/recrutamento de células imunes, mostrando a indução de uma resposta inflamatória intensa da cepa CL Brener quando comparado com a cepa menos virulenta (Oliveira *et al.*, 2020).

Na presença de tratamento com BZ em infecção de fase aguda da DC, o aumento de IL-10 é percebido, o que indica restauração do equilíbrio imunológico e atenuação da resposta imune reguladora (Cevey *et al.*, 2019; Sathler-Avelar *et al.*, 2006). Este fármaco é um antiparasitário com efeitos diretos no parasito, com potenciais efeitos indiretos sobre a modulação imunológica (Gómez *et al.*, 2024; Vallejo *et al.*, 2016), que pode permitir maior efetividade da resposta imune contra o *T. cruzi*, assim menor carga parasitária.

A elevação desta citocina indica resposta inflamatória ativa para diminuição da parasitemia, além de participar do perfil imunológico de fase aguda (Zaatar *et al.*, 2024; (Li, Körner & Liu, 2020). Na presença de tratamento antiparasitário efetivo há a queda dos níveis de TNF- $\alpha$ , juntamente com a redução da carga parasitária e da estimulação

exacerbada da resposta imune. O tratamento pode modular e/ou reduzir a inflamação sistêmica e prevenir danos teciduais causados por uma resposta imunológica elevada (Li, Körner & Liu, 2020; Zganiacz *et al.*, 2004).

Os animais cronicamente infectados apresentaram níveis baixos comparados a fase aguda, assim como é esperado níveis basais para os grupos não infectados. Isso demonstra a redução drástica da resposta Th1, que pode permanecer ou flutuar dependendo da atividade/estímulo inflamatório tecidual, no caso da infecção crônica.

Em animais na fase crônica da DC a resposta inflamatória é menos intensa e localizada nos tecidos parasitados, assim os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  diminuem (Choudhuri, 2020; Meira *et al.*, 2019; Wan *et al.*, 2019), diferente da inflamação sistêmica com predomínio de citocinas IL-10 (Hovsepian *et al.*, 2013; Meira *et al.*, 2019). Ao associar o tratamento com BZ e imunossupressão posterior suprime a resposta inflamatória, com os níveis de TNF-  $\alpha$  decaindo.

O uso de imunossupressores reduz diretamente a produção de IFN- $\gamma$  na ausência ou não de infecção (Wang *et al.*, 2021), o que indica a relação da citocina tanto na presença do parasito quanto na funcionalidade do sistema imunológico. A combinação do tratamento com a imunossupressão reduz a resposta inflamatória e as respostas protetoras.

Assim como para outras citocinas, ao realizar o tratamento na fase aguda da DC leva a diminuição do estímulo inflamatório, reduz a IL-6 devido inibição da resposta imune. Como foi mostrado nesse trabalho, os níveis de IL-6 foram aumentados nos animais infectados com cepa CL Brener sem o tratamento, e de forma interessante os níveis dessa citocina decaíram em níveis bem próximos ao dos animais sem infecção.

Ao compararmos as fases aguda e crônica da DC, os níveis de IL-6 são elevados na primeira e menores ou basais na segunda, com resposta inflamatória menos intensa e localizada (Sousa *et al.*, 2014). Isso pode ser observado nessa pesquisa, que na ausência da infecção os níveis de IL-6 são zerados e ao quantificar os animais crônicos de cepa Colombiana, apresentaram os menores níveis, se aproximando dos valores encontrados nos animais infectados pela cepa CL e tratados com BZ.

Ao analisar os resultados considerados zero para as citocinas IL-2, IL-4 e IL17-a, podemos destacar que a elevação dos níveis de IL-10 pode suprimir os níveis de citocina IL-2 (Kumar *et al.*, 2013; Sundstedt *et al.*, 2003). A resposta Th1 é a predominante na DC, enquanto a IL-4 está associada com a resposta Th2, assim pode

permanecer inalterada (Nogueira *et al.*, 2014). O mesmo ocorre com a citocina Th17a.

Uma característica importante do BZ, é seu efeito imunomodulador, com propriedades anti-inflamatórias. Estudo realizado por Cevey e colaboradores (2019), demonstraram em modelo *in vitro* de cultura primária de cardiomiócitos e *in vivo*, que o fármaco possui tendência em aumentar a expressão de interleucina IL-10, necessária para a inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 mediada por BZ. A adição exógena de IL-10 *in vitro* também restaurou o efeito inibitório do BZ através da liberação de NO, comprovando a ativação do eixo IL-10/ STAT3/SOCS3, o aumento a expressão de SOCS3 e fosforilação de STAT3 e a diminuição de iNOS envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios do fármaco (Cevey *et al.*, 2019). Conforme essa capacidade do fármaco em modular a resposta imune, os achados nesse trabalho mostraram níveis de expressão de IL-10 semelhantes para as duas cepas utilizadas, e os menores níveis quantificados em relação à outras citocinas.

Diante do exposto nesse trabalho, é importante destacar que vários órgãos/tecidos servem como reservatório para recrudescência e permanência do parasito no hospedeiro; que o fármaco de referência assim como outras moléculas conseguem suprimir a parasitemia em fase aguda em 100% mostrando perfil semelhante de resposta imune entre cepas resistente e susceptíveis ao BZ.

Portanto, investigar a biodistribuição tecidual permite entender se a resistência está ligada apenas a mecanismos moleculares do parasito ou também a barreiras farmacológicas e teciduais, ajudando a direcionar o sucesso ou fracasso no tratamento da DC.

## 6 CONCLUSÃO

A cepa Colombiana possui o coração, músculo esquelético e tecido adiposo como importantes reservatórios do parasito durante a fase aguda. Para essa cepa, que é multidroga-resistente *in vivo*, os tratamentos com benznidazol e E1224 foram eficientes em reduzir drasticamente a carga parasitária na fase aguda. Contudo, após o tratamento, o parasito recrudesce em diferentes sítios, a depender do fármaco; particularmente no tecido adiposo, coração e intestino grosso de animais tratados previamente com benznidazol e coração, músculo esquelético e fígado de animais tratados com E1224, podendo contribuir para a falha terapêutica.

Para a cepa CL, susceptível à terapia específica, nenhum tecido foi reservatório do parasito pós-tratamento.

O perfil de citocinas resultante da infecção aguda murina é similar independente do perfil de susceptibilidade da cepa ao tratamento específico, e, após o tratamento, é similar entre as classes farmacológicas utilizadas, sugerindo que esse perfil não está relacionado à resposta ao tratamento ou à existência de órgãos reservatórios do parasito.

## REFERÊNCIAS

- ABRAS, A. *et al.* Worldwide control and management of Chagas disease in a new era of globalization: a close look at congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Clinical Microbiology Reviews**: American Society for Microbiology, Washington, v. 35, n. 2, feb. 2022.
- ACEVEDO, G., GIRARD, M., & GÓMEZ, K. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 9, p. 1929, ago. 2018.
- ALBA-ALVARADO, M. *et al.* Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 178, p. 134-141, feb. 2018.
- ALCANTARA, C. L. *et al.* Cytosol-living *Trypanosoma cruzi* amastigotes scavenge cholesterol from host ER and Golgi complex. **bioRxiv**: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, jul. 2024.
- ALEJANDRA, A. *et al.* Marginal risk of domestic vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission after improved vector control of *Triatoma infestans* across a rural-to-urban gradient in the Argentine Chaco. **Acta tropica**, v. 243, 106933, jul. 2023.
- ALEJANDRA, A. *et al.* Unusual frequency of *Trypanosoma cruzi* DTU TcI and predominance of hybrid lineages in *Triatoma infestans* before and after control interventions in the Argentinian Chaco. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 261, 107502, jan. 2024.
- ALONSO-PADILLA, J. *et al.* Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. **Expert Rev Anti Infect Ther**, Abingdon, v. 17, n. 3, p. 145-57, mar. 2019.
- ANDRADE, L.O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol. Biochem. Parasitol.**: Elsevier, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 163–172, may. 1999.
- ANDRADE, A. L. *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**: Lancet Publications, Minneapolis, v. 348, n. 9039, p. 1407–13, nov. 1996.
- ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 17-27, 1990.
- ANDRADE, S. G. *et al.* Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Méd. Bahia**, Bahia, v. 70, p. 32-42, 1970.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no

Recônvaco baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). **Revista Patologia Tropical**, Goiânia, v. 1, p. 65-121, out. 1974.

ANDRADE, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental parasitology**: Academic Press, Orlando, v. 100, n. 4, p. 269-75, apr. 2002.

ANDRADE, G. N. Prevalence of Chagas disease among Latin American immigrants in non-endemic countries: an updated systematic review and meta-analysis. **Lancet Reg Health Eur**, London, v. 46, set. 2024.

AÑEZ, N., & CRISANTE, G. The tissue specific tropism in *Trypanosoma cruzi*. Is it true? **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 213, 105736, jan. 2020.

AMIOKA, N. *et al.* Pathological and clinical effects of interleukin-6 on human myocarditis. **Journal of Cardiology**: Elsevier, Tóquio, v. 78, n. 2, p.157-165, ago. 2021.

ARIAS, A. *et al.* Chagas disease control-surveillance in the Americas: the multinational initiatives and the practical impossibility of interrupting vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 117, 2022.

ARIAS-DEL-ANGEL, J. A. *et al.* Dynamics of Mammalian Cell Infection by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, **Front. Microbiol.**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 11, oct. 2020.

BAHIA, M.T. *et al.* Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis.**: Public Library of Science, San Francisco, v. 6, n.11, nov. 2012.

BAHIA, M. T. *et al.* Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole Metabolites, Potential New Drug Candidates for Chagas Disease. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**: American Society for Microbiology, Washington, v. 58, n. 8, p. 4362-4370, 2014.

BERN, C. *et al.* Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**: The University of Chicago Press, Chicago, v. 49, n. 11, p.1667-74, dec. 2009.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, Mass., US: Massachusetts Medical Society, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, jun. 2011.

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

BOARI, T. *et al.* IL-17RA Signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-Producing neutrophils. **PLoS Pathogens**: Public Library of Science, San Francisco, v. 8, n. 4,

apr. 2012.

BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**: Annual Reviews, Califórnia, v. 14, p. 421–47, oct. 2019.

BRAGA, Y. *et al.* Interleukin-32 $\gamma$  in the control of acute experimental Chagas disease. **Journal of Immunology Research**: Hindawi Publishing Corporation, Cairo, jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Chagas (PCDT). Brasília, 2018. Disponível em: [https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/pcdt\\_doenca\\_de\\_chagas.pdf](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/pcdt_doenca_de_chagas.pdf). Acesso em 18 ago de 2025.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 5, p. 220-224, 1963.

BRENER, Z. Laboratory acquired Chagas' disease: an endemic disease among parasitologists? In: Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual. (Ed. C. M. Morel), Rio de Janeiro. T.D.R., WHO, FINED, FIOCRUZ, p. 3-9, 1984.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**: University of Chicago Press, Chicago, v. 209, n. 1, p. 150–162, 2014.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* A modified drug regimen clears active and dormant trypanosomes in mouse models of Chagas disease. **Science Translational Medicine**: American Association for the Advancement of Science, Washington, v. 12, n. 567, oct. 2020.

BUTCHER, M., & ZHU, J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. **Faculty Reviews**, London, v. 10, n. 30, mar. 2021.

CAI, C. *et al.* Th17 Cells provide mucosal protection against gastric *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**: American Society For Microbiology, Washington, v. 89, n. 7, jun. 2021.

CAI, C. *et al.* Th17 Cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**: Public Library of Science, San Francisco, v. 12, n. 10, oct. 2016.

CAL, M. *et al.* Assessing anti-*T. cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidalty. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**: Elsevier, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 165-170, dec. 2016.

CALDAS, I. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Experimental Parasitology: Academic Press**, Orlando, v. 118, n. 3, p. 315-323, mar. 2008.

CALDAS, S. *et al.* Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v.123, n. 3, p. 170-7, sep. 2012.

CALDAS, I. S. *et al.* Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. **TM & IH. Tropical Medicine and International Health**: Blackwell Scientific Publications, Oxford, v. 18, n. 1, p. 75-84, jan. 2013.

CALVET, C. *et al.* Long term follow-up of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease manifestations in mice treated with benznidazole or posaconazole. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 14, n. 9, sep. 2020.

CAMPOS, M. C. *et al.* Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the frontline drug benznidazole. **Sci. Rep.**: Nature Publishing Group, London, v. 7, n. 1, p. 14407, oct. 2017.

CANTILLO-BARRAZA, O. *et al.* *Triatoma venosa* and *Panstrongylus geniculatus* challenge the certification of interruption of vectorial *Trypanosoma cruzi* transmission by *Rhodnius prolixus* in eastern Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 19, jan. 2025.

CARADONNA, K. L. *et al.* Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Host Microbe**: Cell Press, Cambridge, v.13, n. 1, p. 108–117, jan. 2013.

CARDILLO, F. *et al.* Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and disease**: Oxford University Press, United States, v. 73, n. 9, dec. 2015.

CARDOSO, C. *et al.* Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Scienc, San Francisco, v. 12, n. 11, nov. 2018.

CARLINI, V. *et al.* The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 14, jun. 2023.

CASTRO, A. P.A *et al.* *In vivo* schistosomicidal activity of 7-epiclusianone and its quantification in the plasma of healthy and *Schistosoma mansoni* infected mice using UPLC-MS/MS. **Phytomedicine**, Hackerdrucke, v. 38, p. 66-73, jan. 2018.

CAMANDAROBA, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism. **Int J Exp Pathol**, Hoboken, v. 87, n. 3, p. 209-217, jun. 2006.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease

with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo:** Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 29-37, feb. 2002.

CARMO NETO, J. R. The Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* induces a proinflammatory profile, neuronal death, and collagen deposition in the intestine of C57BL/6 mice both during the acute and early chronic phase. **Mediators Inflamm.**, London, jan. 2022.

CEVEY, Á. *et al.* IL-10/STAT3/SOCS3 Axis is involved in the anti-inflammatory effect of Benznidazole. **Frontiers in Immunology:** Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 10, jun. 2019.

CHABEN, I. Pautas para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Argentina, Buenos Aires: Ministerio de Salud; 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 1909.

CHOE, S. S. *et al.* Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Frontiers in Endocrinology**, Switzerland, v. 7, p. 30, apr. 2016.

CHOUDHURI, S., & GARG, N. PARP1-cGAS-NF-κB pathway of proinflammatory macrophage activation by extracellular vesicles released during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. **PLoS Pathogens:** Public Library of Science, San Francisco, v.16, n. 4, apr. 2020.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 102, p. 113–122, ago. 2007.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002.

COURA, J. R. & JUNQUEIRA, A. C. V. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. **Acta tropica:** Elsevier, Amsterdam, v. 151, p. 51-57, nov. 2015.

COMBS, T. *et al.*, The Adipocyte as an Important Target Cell for *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 280, p. 24085-24094, jun. 2005.

COSTA, F. C. *et al.* Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence–fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid *in vivo* localisation and phenotyping. **PLoS Negl Trop Dis.:** Public Library of Science, San Francisco, v. 12, n. 4, apr. 2018.

CRISTOVÃO-SILVA, A. *et al.* Chagas disease: Immunology of the disease at a glance. **Cytokine & Growth Factor Reviews:** Elsevier Science, Oxford, v. 62, p15-

22, dec. 2021.

CRUZ, J. S. *et al.* Altered cardiomyocyte function and *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Am J Trop Med Hyg.**: American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Northbrook, v. 94, n. 5, p.1028-1033, may. 2016.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and biochemical parasitology**: Elsevier, Amsterdam, v.129, n. 1, p. 53-59, jun. 2003.

DA SILVA, L. *et al.* Participation of TLR2 and TLR4 in cytokines production by patients with symptomatic and asymptomatic chronic Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**: Blackwell Scientific Publications, Oxford, v. 85, n. 1, p. 58-65, jan. 2017.

DEEKS, E. D. Fexinidazole: First Global Approval. **Drugs**: ADIS Press, New York, v. 79, n. 2, p. 215-220, feb. 2019.

DEGENER, F. *et al.* Inflammatory Responses in Pediatric Patients with Suspected Myocarditis. **The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation**: Elsevier, Nova York, v. 39, n. 4, p.130, apr. 2020.

DESALE, H. *et al.* PBMC transcriptomic signatures reflect *Trypanosoma cruzi* strain diversity and trained immunity in chronically infected macaques. **JCI Insight**: American Society for Clinical Investigation, Michigan, v. 10, n. 4, jan. 2025.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V. Prevenção sobre as diferentes vias alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 68-72, may. 2011.

DIAS, J. C. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.

DILWORTH, L., FACEY, A., & OMORUYI, F. Diabetes Mellitus and Its Metabolic Complications: The Role of Adipose Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**: MDPI, Basel, v. 22, n. 14, jul. 2021.

DINIZ, L. F. *et al.* Effects of Ravuconazole Treatment on Parasite Load and Immune Response in Dogs Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**: American Society for Microbiology, Washington, v. 54, n. 7, p. 2979-2986, jul. 2010.

DINIZ, L. DE F. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 7, n. 8, 2013.

DINIZ, L. DE F. *et al.* Outcome of E1224-Benznidazole Combination Treatment for

Infection with a Multidrug-Resistant *Trypanosoma cruzi* Strain in Mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**: American Society for Microbiology, Washington, v.62, n. 6, 2018.

DOMINGUES, C. *et al.* Host Genetics Background Influence in the Intragastic *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 11, nov. 2020.

DRAGOO, J. L. *et al.* The essential roles of human adipose tissue: Metabolic, thermoregulatory, cellular, and paracrine effects. **Journal of Cartilage and Joint Preservation**: Elsevier, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 100023, sep. 2021.

DURAN-REHBEIN, G. A. *et al.* Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. **Parasite**: Princeps Editions, Issy-les-Moulineaux, v. 21, p. 38-46, aug.2014.

DUTRA, W. *et al.* Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**: Wiley, Oxford, v. 36, n. 8, aug. 2014.

DUTRA, W. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 208-18, 2009.

EIRO, M. *et al.* Reduced *Trypanosoma cruzi*-specific humoral response and enhanced T cell immunity after treatment interruption with benznidazole in chronic Chagas disease. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**: Academic Press, London, v. 76, n. 6, p. 1580–1592, may. 2021.

ERNST, L., MACEDO, G., & MCCALL, L. System-based insights into parasitological and clinical treatment failure in Chagas disease. **mSystems**: American Society for Microbiology, Washington, v. 10, n. 2, feb. 2025.

FABRINO, D. *et al.* Histological approaches to study tissue parasitism during the experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Methods in molecular biology**: N.J.: Humana Press, Clifton, v. 689, p. 69-80, 2011.

FERREIRA, A. V. M. *et al.* Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and infection**: Elsevier, New York, v. 13, n. 12-13, p. 1002-1005, nov. 2011.

FERREIRA, B. BALB/c e C57BL/6 Mice cytokine responses to *Trypanosoma cruzi* infection are independent of parasite strain infectivity. **Frontiers in Microbiology**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 9, p. 553, mar. 2018.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**: Baltimore, Northbrook, v. 13, p. 272-80, mar. 1964.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research - Application Number: 209570orig1s000. Labeling, Reference ID: 4146149. 2017

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**: Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FRANCO, C. H. *et al.* Drug Discovery for Chagas Disease: Impact of Different Host Cell Lines on Assay Performance and Hit Compound Selection. **Tropical Medicine and Infectious Disease**: MDPI, Basel, v. 4, n. 2, may. 2019.

FRANCO, C. H. *et al.* Novel structural CYP51 mutation in *Trypanosoma cruzi* associated with multidrug resistance to CYP51 inhibitors and reduced infectivity. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.**: Elsevier, Amsterdam, v. 13, p.107–20, aug. 2020.

FRANCO, D. J. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. **Experimental parasitology**: Academic Press, Orlando, v.104, n. 1-2, p. 54-61, 2003.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infections revealed by highly sensitive *In vivo* imaging. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 59, n. 8, p. 4653-61, ago. 2015.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. **Nature Publishing Group**, London, p. 1–11, 2016.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Assessing the effectiveness of curative Benznidazole treatment in preventing chronic cardiac pathology in experimental models of Chagas disease. **Antimicrob Agents Chemother.**: American Society for Microbiology, Washington, v. 62, n. 10, sep. 2018.

FREITAS, J. M. *et al.* Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International journal for parasitology**: Elsevier Science, Oxford, v. 35, n. 4, p. 411-7, apr. 2005.

FRIGOLET, M. E.; GUTIERREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gaceta Médica de México**: Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional, México, v. 156, n. 2, p. 142-149, 2020.

GABALDÓN-FIGUEIRA, J. C. *et al.* State-of-the-art in the drug discovery pathway for Chagas disease: A framework for drug development and target validation. **Res Rep Trop Med.**: Dove Medical Press, Auckland, v. 14, p. 1-19, jun. 2023.

GALVÁN, I. L. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**: Taylor & Francis Ltd, London, v. 19, p. 547 -556, 2020.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**: Elsevier, Amsterdam, v. 115, p. 22–27, 2010.

GAZZINELLI, B. P. *et al.* Development of a stability indicator assay method by

HPLC–DAD and MS characterization of forced degradation products of ravuconazole. **Journal of Chromatographic Science**: Oxford University Press, Oxford, v. 60, n. 2, p. 157-163, feb. 2022.

GOODPASTER, B. *et al.* Intermuscular adipose tissue in metabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**: Nature Pub. Group, London, v. 19, p. 285-298, dec. 2022.

GÓMEZ, I. *et al.* Differential expression of immune response genes in asymptomatic chronic Chagas disease patients Versus healthy subjects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**: Frontiers Media SA, Lausanne, v. 11, sep. 2021.

GÓMEZ, I. *et al.* The expression of immune response genes in patients with chronic Chagas disease is shifted toward the levels observed in healthy subjects as a result of treatment with Benznidazole. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**: Frontiers Media SA, Lausanne, v. 14, jul. 2024.

GÓMEZ, I. *et al.* Differential expression profile of genes involved in the immune response associated to progression of chronic Chagas disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 17, n. 7, jul. 2023.

GONÇALVES, K. R. *et al.* The entrance route: Oral, mucous, cutaneous, or systemic has a marked influence on the outcome of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Acta Trop.**: Elsevier, Amsterdam, v. 234, oct. 2022.

GUARNER, J. *et al.* Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**: Baltimore, Northbrook, v. 65, n. 2, p. 152-8, aug. 2001.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Activity of the New Triazole Derivative Albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Dog Hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: American Society for Microbiology, Washington, v. 48, n. 11, p. 4286-4292, 2004.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Rev Anti Infect Ther.**: Future Drugs Ltd, London, v. 9, n. 5, p. 609-620, may. 2011.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Deficient regulatory T Cell activity and low frequency of IL-17-producing T Cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 6, n. 4, 2012.

GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**: National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, v. 9, n.1, p. 29-32, jan. 2003.

GÜRTLER, R. E.; FERNÁNDEZ, M. P.; CARDINAL, M. V. Eco-Epidemiology of vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* in domestic habitats. **Triatominae -**

**The Biology of Chagas Disease Vectors:** Springer Nature, Berlin, v. 5, p. 447-489, jul. 2021.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Benznidazole decreases the risk of chronic Chagas disease progression and cardiovascular events: A long-term follow up study. **EClinicalMedicine:** The Lancet, London, v. 31, dec. 2020.

HALL, B. S., WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrob Agents Chemother:** American Society for Microbiology, Washington, v. 56, n. 1, p. 115-23, jan. 2012.

HOVSEPIAN, E. *et al.* IL-10 Inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. **PLoS ONE:** Public Library of Science, San Francisco, v. 8, n. 11, nov. 2013.

HUTCHINS, A., DIEZ, D., & MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Briefings in Functional Genomics:** Oxford University Press, Oxford, v. 12, n. 6, p. 489-498, nov. 2013.

IKONEN, E.; OLKKONEN, V. M. Intracellular cholesterol trafficking. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology:** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, v. 15, n. 8, aug. 2023.

KAHN, C. *et al.* Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation:** American Society for Clinical Investigation, New Haven, v. 129, n. 10, p. 3990-4000, oct. 2019.

KAUR, S. *et al.* A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry:** Elsevier Science, Oxford, v. 28, n. 5, mar. 2020.

KRATZ, J. M. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of. **Expert Rev Clin Pharmacol.:** Taylor & Francis, Oxford, v. 11, n. 10, p. 943-57, oct. 2018.

KRATZ, J. M. *et al.* The translational challenge in Chagas disease drug development. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 117, jan. 2022.

KUMAR, N. *et al.* IL-10 Dependent Suppression of Type 1, Type 2 and Type 17 Cytokines in Active Pulmonary Tuberculosis. **PLoS ONE:** Public Library of Science, San Francisco, v. 8, n. 3, mar. 2013.

KUMARI, M. *et al.* Regulation of immunometabolism in adipose tissue. **Seminars in Immunopathology:** Springer, Berlin, v. 40, n. 2, p. 189-202, feb. 2018.

KOH, C. *et al.* Cytokine Networks as targets for preventing and controlling Chagas heart disease. **Pathogens:** MDPI AG, Basel, v. 12, n. 2, jan. 2023.

LARKINS-FORD, J. *et al.* Design principles to assemble drug combinations for effective tuberculosis therapy using interpretable pairwise drug response measurements. **Cell Rep Med.**: Cell Press, Cambridge, v. 3, n. 9, sep. 2022.

LENZI, H. L., *et al.* *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Exp Parasitol.**: Academic Press, Orlando, v. 84, n. 1, p. 16-27, out.1996.

LEWIS, M. *et al.* Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**: John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, v. 16, p. 1285 -1300, 2014.

LI, X., KÖRNER, H., & LIU, X. Susceptibility to intracellular infections: contributions of TNF to immune defense. **Frontiers in Microbiology**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 11, jul. 2020.

LIMA-NEIVA, V. *et al.* The connection between *Trypanosoma cruzi* transmission cycles by *Triatoma brasiliensis brasiliensis*: A threat to human health in an area susceptible to desertification in the Seridó, Rio Grande do Norte, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 15, n. 11, nov. 2021.

LIZARDO, K. *et al.* Fat tissue regulates the pathogenesis and severity of cardiomyopathy in murine chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**. Public Library of Science, San Francisco, v. 15, n. 4, apr. 2021.

LUO, W. *et al.* Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 13, aug. 2022.

LUO, L. *et al.* Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**: Society for Endocrinology, Bristol, v. 231, n. 3, p. 77- 99, dec. 2016.

MACHADO, J. R. *et al.* Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. **Biomed Res Int.**: Hindawi Pub. Co., New York, jun. 2014.

MACHADO, Y. A. *et al.* Amlodipine increases the therapeutic potential of ravuconazole upon T infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Online)**: American Society for Microbiology, Washington, v. 64, n. 8, jul. 2020.

MARQUES DE JESUS, S. *et al.* Pharmacokinetics of Benznidazole in Experimental Chronic Chagas Disease Using the Swiss Mouse-Berenice-78 *Trypanosoma cruzi* Strain Model. **Antimicrob Agents Chemother**: American Society for Microbiology, Washington v. 65, n. 2, jan. 2021.

MARTYNOVA, E. *et al.* Inflammasome Contribution to the Activation of Th1, Th2, and Th17 Immune Responses. **Frontiers in Microbiology**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 13, mar. 2022.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic

review and meta-analysis. **Acta Trop**: Elsevier, Amsterdam, v. 130, p. 167-74, feb. 2014.

MARTONIK, D. *et al.* The Role of Th17 Response in COVID-19. **Cells**: MDPI, Basel, v. 10, n. 6, jun. 2021.

MATHIAS, F. A. S. *et al.* The Use of an adjuvant system improves innate and adaptive immune response when associated with a *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigen in a vaccine candidate against *L. (Leishmania) infantum* infection. **Vaccines**: MDPI AG, Basel, v. 11, n. 2, p.395, feb. 2023.

MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol. Part. A. Mol. Integr. Physiol.**, New York, v. 146, n. 4, p. 601-620, apr. 2007.

MAZZETI, A. L. *et al.* Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: A pre-clinical study. **Biochemical Pharmacology**, New York, US: Pergamon Press, v. 148, p. 213–221, feb. 2018.

MEIS, J. *et al.* Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 3, n. 7, jul. 2009.

MEIRA, C. *et al.* Betulinic acid derivative BA5, attenuates inflammation and fibrosis in experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy by inducing IL-10 and M2 polarization. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 10, jun. 2019.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.

MOLINA, J. A. P.; MOLINA, I. Chagas Disease. **The Lancet**: Elsevier, London, v. 391, p. 82-94, jan. 2018.

MOLINA, I. *et al.* Randomized trial of posaconazole and Benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**: Massachusetts Medical Society, Boston, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, may. 2014.

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother**: American Society for Microbiology, Washington, v. 61, n. 4, mar. 2017.

MONTILLA, C. P. *et al.* Main metabolites of benznidazole in patients treated for Chagas disease: identification based on mass spectrometry, structural analysis, and detoxification pathways. **Toxicology Letters**: Elsevier, Amsterdam, v. 15, n. 377, p. 71-82, mar. 2023.

MORAES, C. B. *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51

inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Sci. Rep.**: Springer Nature, London, v. 4, p. 1-11, apr. 2014.

MOREIRA, L. *et al.* Interaction between peripheral blood mononuclear cells and *Trypanosoma cruzi*-infected adipocytes: implications for treatment failure and induction of immunomodulatory mechanisms in adipose tissue. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 15, mar. 2024.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of the American College of Cardiology**: Elsevier Science Publishers, New York, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MORROT, A, *et al.* Evasion and immuno-endocrine regulation in parasite infection: two sides of the same coin in chagas disease? **Frontiers in microbiology**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 7, p. 704, may. 2016.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **Journal of Infectious Diseases**: University of Chicago Press, Chicago, v. 205, n. 5, p. 830-840, mar. 2012a.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**: Wiley-Blackwell, Oxford, v. 14, n. 5, may. 2012b.

NEVES, R. F. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: cell surface dynamics in trypomastigotes of different strains. **Parasitology**: Cambridge University Press., London, v. 147, n. 3, p. 310-321, mar. 2019.

NOGUEIRA, L. *et al.* Myocardial Gene Expression of T-bet, GATA-3, Ror- $\gamma$ t, FoxP3, and Hallmark Cytokines in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: An Essentially Unopposed TH1-Type Response. **Mediators of Inflammation**: Rapid Communications of Oxford Ltd., Oxford, jul. 2014.

NOYA, B., & GONZÁLEZ, O. An ecological view of the factors leading to the oral transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 151, p. 94-102, nov. 2015.

OLIVEIRA, A. E. R. *et al.* Gene expression network analyses during infection with virulent and avirulent *Trypanosoma cruzi* strains unveil a role for fibroblasts in neutrophil recruitment and activation. **PLoS Pathogens**: Public Library of Science, San Francisco, v. 16, n. 8, aug. 2020.

OLIVIERI, B. P. *et al.* Ação tripanocida de azóis: avaliação *in vitro* e *in vivo* de compostos antifúngicos frente a *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 732–738, 2010.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**: Elsevier Science, Oxford, v. 30, n. 6, p. 289–298, jun. 2014.

PÉREZ-FUENTES, R. *et al.* Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **International Journal for Parasitology**: Elsevier Science, Oxford, v. 33, n. 3, p. 293-9, mar. 2003.

PERIN, L. *et al.* Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. **Antimicrob Agents Chemother**: American Society for Microbiology, Washington, v. 61, n. 4, mar. 2017.

PERIN, L. *et al.* Population pharmacokinetics and biodistribution of benznidazole in mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**: Academic Press, London, v. 75, n. 8, p. 2213–222, 2020.

PETRAVICIUS, P. O. *et al.* Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. **Acta Tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 200, p. 105-161, dec. 2019.

PINAZO, M. J. *et al.*, Efficacy and safety of fexinidazole for treatment of chronic indeterminate Chagas disease (FEXI-12): a multicentre, randomised, double-blind, phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 395-403, apr. 2024.

PUERTA, C., *et al.* *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells and other immunological hallmarks in chronic Chagas cardiomyopathy: Two decades of research. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**: Frontiers Media SA, Lausanne, v. 12, jan. 2023.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**: Editio Cantor, Aulendorf, v. 29, p. 1611-1614, 1979.

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**: Editio Cantor, Aulendorf, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980.

RAMOS-RINCÓN, J. *et al.* Cytokine profile levels and their relationship with parasitemia and cardiomyopathy in people with Chagas disease in Spain. A prospective observational study. **Parasitology Research**: Springer International, Berlin, v. 123, n. 1, dec. 2023.

RASSI, A. *et al.* Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**: BMJ Pub. Group, London, v. 95, n. 7, p. 524–534, apr. 2009.

RESENDE, B. C. *et al.* The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**: Frontiers Media SA, Lausanne, v. 10, n. 5, jan. 2020.

RIAL, M. S. *et al.* *In vitro* studies and preclinical evaluation of benznidazole microparticles in the acute *Trypanosoma cruzi* murine model. **Parasitology**: Cambridge University Press, New York, v. 148, n. 5, p. 566-575, apr. 2020.

RIOS, L. E. *et al.* Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**: Elsevier, Amsterdam, v. 200, sep. 2019.

RODRIGUES, D. *et al.* *In Situ* Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. **Clinical and Developmental Immunology**: Hindawi Pub. Corporation, Cario, jul. 2012.

RODRÍGUEZ, M. *et al.* Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment. **Cell. Microbiology**: Wiley, Hoboken, v. 22, n. 8, aug. 2020.

ROFFÉ, E. *et al.* IL-10 is required to control both tissue parasitism and fatal myocarditis in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**: Williams & Wilkins, Baltimore, v. 188, n. 2, p. 649-60, jan. 2012.

SALIM, T., SERSHEN, C., & MAY, E. Investigating the Role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. **PLoS ONE**: Public Library of Science, San Francisco, v.11, n. 6, jun. 2016.

SANCHEZ-VALDEZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**: eLife Sciences Publications, Cambridge, v. 7, p. 120, mar. 2018.

SANTOS, D. S. *et al.* Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**: Public Library of Science, San Francisco, v. 11, n. 4, apr. 2017.

SARAIVA, M., & O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**: Nature Pub. Group, London, v.10, n. 3, p. 170-181, mar. 2010.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a Type 1-modulated immune profile. **Scandinavian Journal of Immunology**: Blackwell Scientific Publications, Oxford, v. 64, n. 5, nov. 2006.

SCHETT, G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. **Rheumatology**: Oxford University Press, Avenel, v. 57, p. 43-50, feb. 2018.

SCHÖTTL, T., FISCHER, I., & USSAR, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**: Company Of Biologists Limited, London, v. 221, mar. 2018.

SILBERSTEIN, E. *et al.* A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging. **PLoS One**: Public Library of Science, San Francisco, v. 13, n. 4, apr. 2018.

SILVA, I. DE L. M. F. E T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico Transmission elimination of Chagas'

disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 39, n. 5, p. 507–509, 2006.

SILVA, M. V. *et al.* Upregulation of cardiac IL-10 and downregulation of IFN- $\gamma$  in BALB/c IL-4<sup>-/-</sup> in Acute chagasic myocarditis due to Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. **Mediators Inflamm.**: Wiley, Hoboken, nov. 2018.

SILVA, A. C. *et al.* Dynamics of the *Trypanosoma cruzi* infection in adipose tissue: Assessing gene expression of PNPLA2, FASN, and ACAT1 under benznidazole treatment and indirect mononuclear immune cells interaction, **Molecular and Biochemical Parasitology**: Elsevier, Amsterdam, v. 258, jun. 2024.

SILVA, J. *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected macrophages activated by gamma-interferon. **Infection and Immunity**: American Society For Microbiology, Washington, v. 63, n. 12, p. 4862-4867, dec. 1995.

SOEIRO, M. N. C. *et al.* Perspectives for a new drug candidate for Chagas disease therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 117, jan. 2022.

SOEIRO, M. N. C. *et al.* Drug screening and development cascade for Chagas disease: an update of *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 119, may. 2024.

SOSA-ESTANI, S. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**: American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Arlington, v. 59, n. 4, p. 526-9, 1998.

SOUSA, G. *et al.* Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **Plos ONE**: Public Library of Science, San Francisco, v. 9, n. 3, mar. 2014.

SOUSA, D. M. S. *et al.* Diet Rich in Lard Promotes a Metabolic Environment Favorable to *Trypanosoma cruzi* Growth. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**: Frontiers Media S.A, Lausanne, v. 8, may. 2021

SOUZA-SILVA, T. G. *et al.* Correlation of blood-based immune molecules with cardiac gene expression profiles reveals insights into Chagas cardiomyopathy pathogenesis. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 15, feb. 2024.

SODRÉ, C. *et al.* Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. **Archives of Microbiology**: Springer-Verlag., New York, v. 191, n. 2, p. 177-184, feb. 2009.

STRAUSS, M. *et al.* Differential tissue distribution of *Trypanosoma cruzi* during acute experimental infection: Further evidence using natural isolates. **Molecular and biochemical parasitology**: Elsevier, Amsterdam, v. 222, p. 29-33, jun. 2018.

SULLIVAN, J. J. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: a simplified procedure. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**: Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 76, n. 3, 1982

SUNDSTEDT, A. *et al.* Role for IL-10 in Suppression Mediated by Peptide-Induced Regulatory T Cells *In Vivo*. **The Journal of Immunology**: Oxford University Press, Oxford, v. 170, n. 3, p. 1240 - 1248, feb. 2003.

SUCHACKI, K. *et al.* Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis. **Nature Communications**: Nature Pub. Group, London, v. 11, n. 1, jun. 2020.

TANOWITZ, H. *et al.* Adipose Tissue: A Safe Haven for parasites? **Trends in Parasitology**: Elsevier Science, Oxford, v. 33, n. 4, p. 276-284, apr. 2017.

TARLETON, R. L. Effective drug discovery in Chagas disease. **Trends in Parasitology**: Cell Press, Cambridge, v. 39, n. 6, jun. 2023.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clin Microbiol Rev.**: American Society for Microbiology, Washington, v. 24, n. 3, p. 592-630, jul. 2011.

TORRICO, F, *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Disease**: Elsevier Science, New York, v. 18, n. 4, p. 419-430, apr. 2018.

TORRICO, F. *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **Lancet Infect Dis.**: Elsevier Science, New York, v. 21, n. 8, p. 1129-1140, aug. 2021.

TORRICO, F. *et al.* A Phase 2, Randomized, multicenter, placebo-controlled, proof-of-concept trial of oral fexinidazole in adults with chronic indeterminate Chagas disease. **Clin Infect Dis.**: The University of Chicago Press, Chicago, v. 76, n. 3, feb. 2023.

TRAN, A. *et al.* Trypanothione synthetase locus in *Trypanosoma cruzi* CL Brener strain shows an extensive allelic divergence. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 269-78, jul. 2003.

URBINA, J.A. *et al.*, *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **Int. J. Antimicrob. Agentes**: Elsevier, Amsterdam, v. 21, p. 27 -38, 2003.

VAGO, A. R. *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **The American journal of pathology**: Elsevier, New York, v. 149, n. 6, p. 2153-9, dec. 1996.

VAGO, A. R. *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic

types into diverse organs. **The American journal of pathology**: Elsevier, New York, v. 156, n. 5, p. 1805-9, may. 2000.

VALADARES, H. *et al.* Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **International journal for parasitology**: Elsevier Science, Oxford, v. 38, n. 7, p. 839-50, jun. 2008.

VALLADARES, B. *et al.* Differential expression of immune response genes in asymptomatic chronic Chagas disease patients versus healthy subjects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**: Frontiers Media SA, Lausanne, v. 11, sep. 2021.

VALLEJO, A. *et al.* Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 164, p. 117-124, dec. 2016.

VELLOZO, N., MATOS-SILVA, T., & LOPES, M. Immunopathogenesis in *Trypanosoma cruzi* infection: a role for suppressed macrophages and apoptotic cells. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 14, aug. 2023.

VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opin Drug Discov.**: Taylor & Francis, Oxford, v.14, n. 11, p. 1161-1174, nov. 2019.

VIOTTI, R. *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial, **Annals of Internal Medicine**: American College of Physicians, Philadelphia, v. 144, p. 724–734, may. 2006.

VIOTTI, R. *et al.* Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: American Society for Microbiology, Washington, v. 58, n. 2 p. 635–639, nov. 2013.

VITELLI-AVELAR, D. *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Jornal Escandinavo de Imunologia**: Blackwell Scientific Publications, Oxford, v. 68, n. 5, nov. 2008.

WAN, X. *et al.* Origin of monocytes/macrophages contributing to chronic inflammation in Chagas disease: SIRT1 Inhibition of FAK-NFκB-dependent proliferation and proinflammatory activation of macrophages. **Cells**: MDPI, Basel, v. 9, n. 1, dec. 2019.

WANG, G. *et al.* Cyclosporin A impairs neurogenesis and cognitive abilities in brain development via the IFN-γ-Shh-BDNF pathway. **International immunopharmacology**: Elsevier Science, Amsterdam, v. 96, jul. 2021.

WARD, A. I. *et al.* *In vivo* Analysis of *Trypanosoma cruzi* persistence foci at single-cell resolution. **mBio.**: American Society for Microbiology, Washington, v. 11, n. 4, aug. 2020.

WEI, H., WANG, B., & LI, B. IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology. **Frontiers in Immunology**: Frontiers Research Foundation, Switzerland, v. 11, jun. 2020.

WESLEY, M. *et al.* Correlation of parasite burden, kDNA integration, autoreactive antibodies, and cytokine pattern in the pathophysiology of Chagas disease. **Front Microbiol.**: Frontiers Research Foundation, Lausanne, v. 10, p. 1856, aug. 2019.

WIBMER, A. *et al.* Brown adipose tissue is associated with healthier body fat distribution and metabolic benefits independent of regional adiposity. **Cell Reports Medicine**: Cell Press, Cambridge v. 2, n. 7, jul. 2021.

WHITE, B. *et al.* Serial 'deep- sampling' PCR of fragmented DNA reveals the wide range of *Trypanosoma cruzi* burden among chronically infected human, macaque, and canine hosts, and allows accurate monitoring of parasite load following treatment. **eLife**: eLife Sciences Publications, Cambridge, v. 14, apr. 2025.

WHO. Chagas disease (also known as American tripanosomiasis). Jan. 2025.

WORKMAN, P. *et al.* Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. **British Journal of Cancer**: Springer Nature, London, v. 50, p. 291-303, 1984.

ZAATAR, M. *et al.* Blocking TNF- $\alpha$  Reduces *Leishmania major*- Induced hyperalgesia and changes the cytokine profile in the paw skin of BALB/c mice with a potential positive effect on parasite clearance. **Microbiology Research**: MDPI, Basel, v. 16, n. 1, dec. 2024.

ZGANIACZ, A. *et al.* TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. **The Journal of clinical investigation**: American Society for Clinical Investigation, Arbor, v. 113, n. 3, p. 401-13, feb. 2004.

ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta tropica**: Elsevier, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 159-73, nov. 1997.

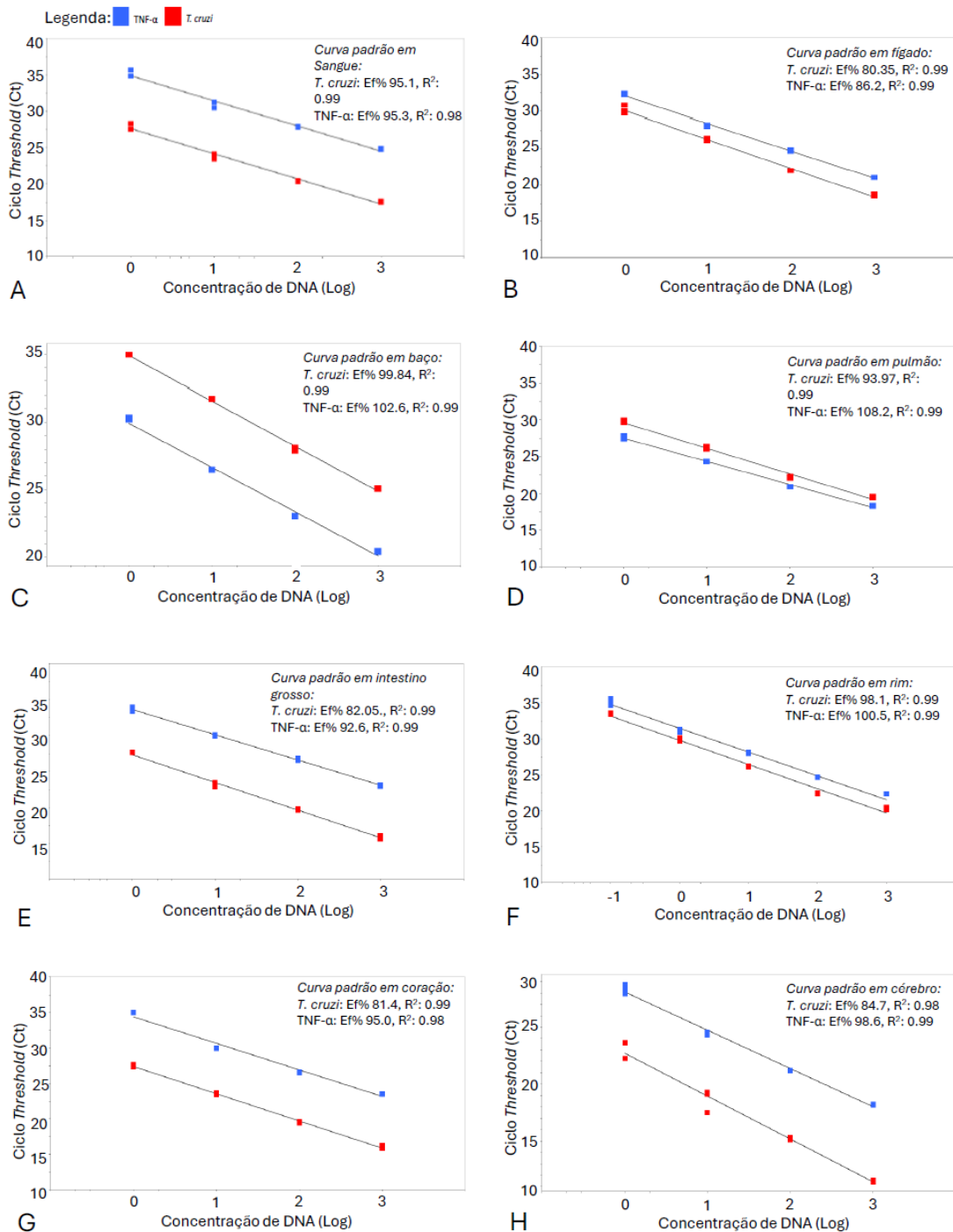
ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, v.104, n. 7, p. 1051 – 1054, 2009.

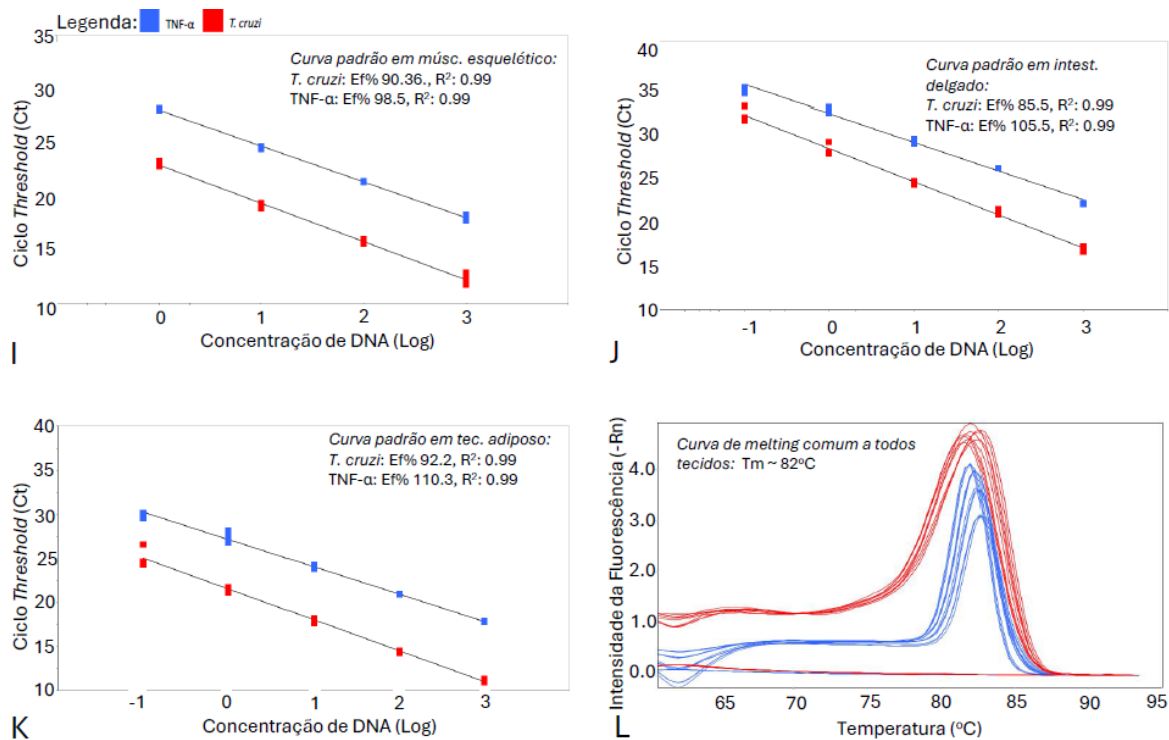
ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**: Elsevier Science, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 240-253, mar. 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**: Revista da USP, São Paulo, v. 6, p. 44–48, 2011.

ZINGALES B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Trop.** : Elsevier, Amsterdam, v. 184, p.38-52, jan. 2018.

## ANEXO A- Curvas padrão para detecção por qPCR de DNA de *Trypanosoma cruzi* em matrizes teciduais de camundongos e curva de melting para adotada.





Nota: Curvas padrão (A–K) para detecção por qPCR de DNA de *Trypanosoma cruzi* em matrizes teciduais de camundongos (25 ng/ $\mu$ L de DNA total; diluição 1:10), com cinco pontos de diluição em triplicata. Painéis: (A) sangue; (B) fígado; (C) baço; (D) pulmão; (E) intestino grosso; (F) rim; (G) coração; (H) cérebro; (I) músculo esquelético; (J) intestino delgado; (K) tecido adiposo e (L) Curva de melting comum, evidenciando um único pico com T<sub>m</sub> ~82 °C para todas as matrizes. As eficiências (Ef%) e R<sup>2</sup> das regressões lineares são exibidas em cada painel. A fax linear define os limites de quantificação precisa, embora ampliações fora dessa faixa também reflitam os níveis do alvo, ainda que com menor precisão. O limite de detecção adotado foi Ct  $\leq$  40 com perfil de melting compatível.