

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIELLA MARTINIANO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO NIFURTIMOX, FEXINIDAZOL-SULFONA,
AMIODARONA E ALOPURINOL FRENTE À INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA*
*CRUZI***

Alfenas/MG

2024

GABRIELLA MARTINIANO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO NIFURTIMOX, FEXINIDAZOL-SULFONA,
AMIODARONA E ALOPURINOL FRENTE À INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA*
*CRUZI***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação patógeno-hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz

Alfenas/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Pereira, Gabriella Martiniano .

Avaliação da citotoxicidade do nifurtimox, fexinidazol-sulfona, amiodarona e alopurinol frente à infecção por *Trypanosoma cruzi* / Gabriella Martiniano Pereira. - Alfenas, MG, 2024.

53 f. : il. -

Orientador(a): Lívia de Figueiredo Diniz.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Fexinidazol. 3. Pré-clínico. 4. Toxicidade. I. Diniz, Lívia de Figueiredo , orient. II. Título.

GABRIELLA MARTINIANO PEREIRA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO NIFURTIMOX, FEXINIDAZOL-SULFONA, AMIODARONA E ALOPURINOL FRENTE À INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Juliana Quero Reimão

Instituição: Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ

Profa. Dra. Patrícia Paiva Corsetti

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Livia de Figueiredo Diniz Castro, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2024, às 20:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1218353** e o código CRC **30F9D613**.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Valdisa, que mesmo sem entender muito bem minhas escolhas enquanto pesquisadora-cientista me apoiou e me deu forças para superar cada barreira.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) pela oportunidade e pelas experiências vividas.

À minha orientadora maravilhosa, Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz, por sua paciência e ensinamentos. Muito obrigada pela dedicação e confiança depositados em mim.

À Profa. Dra. Marisa Ionta e Dr. Guilherme do Laboratório de avaliação de protótipos antitumorais (LAPAN – Unifal-MG), pela colaboração e troca de aprendizado.

À todos os colegas do PPGCB, vocês fizeram essa caminhada mais leve, Laiane, Mateus, Valquíria, Débora, Viviana e todos os professores do Departamento de Parasitologia e Patologia (DPP) por me auxiliarem e serem tão disponíveis. E um agradecimento especial a Enilda, o DPP não seria o mesmo sem seu trabalho duro e seu cuidado.

Ao meu namorado Regiley por seu amor, companheirismo e apoio em todos esses anos. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar a ser sempre a minha melhor versão.

Aos meus amigos de longa data Pedro, Conrado e Mariana por todas as noites de jogos, conversas e risadas. Ter vocês em minha vida é um presente, amo muito vocês.

À Manoel Regilei, Pedro Afonso, Tia Mani, Tia Onilha, Seu João Ramos por serem como uma família para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e às demais agências de fomentos pelo auxílio financeiro.

À todos aqueles que, embora não tenham sido mencionados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Educação é uma descoberta progressiva da nossa própria ignorância.”

(Voltaire)

RESUMO

Estudos sobre a quimioterapia anti-*Trypanosoma cruzi* avançaram muito nos últimos anos, culminando com a avaliação de candidatos a fármacos em estudos clínicos de fase II para o tratamento da doença de Chagas crônica. Porém, devido às limitações relacionadas à eficácia ou tolerabilidade dos candidatos, ainda não há tratamento satisfatório para a fase crônica da infecção. Os resultados obtidos com o fexinidazol, um dos candidatos mais promissores, são particularmente intrigantes; trata-se de um nitroimidazol que apresentou alta eficácia tripanossomicida e tolerabilidade em estudos pré-clínicos e clínicos de fase I, mas ao ser administrado a pacientes com a doença de Chagas induziu neutropenia e hepatotoxicidade relevantes. Muito embora estejam sendo amplamente discutidos os fatores envolvidos nas falhas terapêuticas observadas, os estudos e informações disponíveis na literatura sobre os efeitos tóxicos dos fármacos tripanossomicidas, mesmo aqueles de uso clínico, são escassos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar o perfil de citotoxicidade de fármacos com atividade tripanossomicida utilizando diferentes tipos celulares e tempos de incubação, na ausência ou presença da infecção por *T. cruzi*. Para tanto, foram escolhidos candidatos já avaliados em estudos não clínicos e clínicos – o fexinidazol-sulfona (metabólito ativo do fexinidazol), a amiodarona e o alopurinol, além do nifurtimox, que é um dos medicamentos de referência no tratamento da doença de Chagas. Células H9c2 e HepG2 foram incubadas ou não com os fármacos por dois períodos distintos, 72 e 120 horas, na ausência e presença da infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. A viabilidade das células hospedeiras foi aferida por meio da redução de resazurina, comparativamente às células não infectadas e não tratadas. Foram realizados ainda, para fexinidazol-sulfona, ensaios de viabilidade com Sulforodamina B e avaliação da proliferação em esquema prolongado de tratamento (192 horas) por meio da determinação da CPD (*cumulative population doubling*). Os resultados dos ensaios com resazurina mostraram que o perfil de toxicidade foi variável para o tipo celular e fármaco, sugerindo relação com os mecanismos de ação e fisiologia das células. O fexinidazol-sulfona apresentou níveis baixos de interferência na viabilidade de ambas as células, com redução significativa da viabilidade celular a partir de 1mM. A amiodarona apresentou efeito tóxico concentração e tempo-dependente, com valores de CC-50 de 15µM a 41 µM. Já o nifurtimox induziu maior toxicidade em H9c2, enquanto o alopurinol foi significativamente mais tóxico para HepG2. A infecção pelo parasito não exerceu influência expressiva no perfil de viabilidade das células tratadas, provavelmente pela atividade anti- *T. cruzi* dos fármacos nas concentrações avaliadas. A determinação da viabilidade das células HepG2 utilizando Sulforodamina B mostrou perfil citotóxico tempo e concentração-dependente para fexinidazol-sulfona, sobretudo em concentrações a partir de 1mM. A determinação da CPD para o mesmo tipo celular revelou redução expressiva da proliferação celular a partir de 96 horas de tratamento com fexinidazol-sulfona, particularmente nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM. Os resultados demonstraram, no contexto do desenvolvimento farmacológico anti- *T. cruzi*, a importância da utilização do tempo de tratamento prolongado para avaliação da citotoxicidade de fármacos e podem auxiliar no delineamento de experimentos que contribuam para aumento do valor translacional dos estudos pré-clínicos de novos candidatos a fármacos.

Palavras-chave: Doença de Chagas; fexinidazol; pré-clínico; toxicidade.

ABSTRACT

Research on anti-*Trypanosoma cruzi* chemotherapy has advanced significantly in recent years, culminating in the evaluation of drug candidates in phase II clinical trials for the treatment of chronic Chagas disease. However, due to limitations related to the efficacy or tolerability of candidates, there is still no satisfactory treatment for the chronic phase of the infection. The results obtained with fexinidazole, one of the most promising candidates, are particularly intriguing; it is a nitroimidazole that showed high trypanocidal efficacy and tolerability in preclinical and phase I clinical studies, but when administered to Chagas disease patients, it induced relevant neutropenia and hepatotoxicity. Although the factors involved in the observed therapeutic failures are widely discussed, studies and information available in the literature on the toxic effects of trypanocidal drugs, even those in clinical use, are scarce. Therefore, the aim of this study was to investigate the cytotoxicity profile of drugs with trypanocidal activity using different cell types and incubation times, in the absence or presence of *T. cruzi* infection. For this purpose, candidates already evaluated in non-clinical and clinical studies were chosen – fexinidazole-sulfone (the active metabolite of fexinidazole), amiodarone, and allopurinol, in addition to nifurtimox, which is one of the reference drugs in the treatment of Chagas disease. H9c2 and HepG2 cells were incubated with the drugs for two different periods, 72 and 120 hours, in the absence and presence of *T. cruzi* Y strain infection. The viability of host cells was assessed by resazurin reduction compared to untreated and uninfected cells. Additionally, viability assays with Sulforhodamine B and proliferation evaluation under prolonged treatment (192 hours) were performed for fexinidazole-sulfone by determining the CPD (cumulative population doubling). The results of the resazurin assays showed that the toxicity profile varied according to cell type and drug, suggesting a relationship with the mechanisms of action and physiology of the cells. Fexinidazole-sulfone showed low interference with the viability of both cell types, with significant reduction in cell viability from 1mM onwards. Amiodarone exhibited concentration and time-dependent toxic effects, with CC-50 values ranging from 15µM to 41µM. Nifurtimox induced greater toxicity in H9c2 cells, while allopurinol was significantly more toxic for HepG2 cells. Parasite infection did not exert a significant influence on the viability profile of treated cells, likely due to the anti-*T. cruzi* activity of the drugs at the evaluated concentrations. The determination of HepG2 cell viability using Sulforhodamine B showed a time and concentration-dependent cytotoxic profile for fexinidazole-sulfone, especially at concentrations from 1mM onwards. CPD determination for the same cell type revealed a significant reduction in cell proliferation from 96 hours of treatment with fexinidazole-sulfone, particularly at concentrations of 1.0 and 2.0 mM. These results demonstrate, in the context of anti-*T. cruzi* pharmacological development, the importance of using prolonged treatment time to evaluate drug cytotoxicity and may assist in designing experiments that contribute to increasing the translational value of preclinical studies of new drug candidates.

Keywords: Chagas disease; fexinidazole; preclinical, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Graphical abstract</i> dos ensaios realizados para averiguar citotoxicidade dos fármacos tripanossomicidas.....	23
Figura 2 -	Efeito do DMSO na viabilidade das células HepG2 e H9c2.....	28
Figura 3 -	Impacto do tipo celular no perfil de citotoxicidade dos fármacos tripanossomicidas	30
Figura 4 -	Impacto do tipo celular hospedeiro no perfil de citotoxicidade dos fármacos tripanossomicidas sob exposição prolongada.....	32
Figura 5 -	Avaliação da interferência da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> na viabilidade celular	35
Figura 6 -	Influência dos fármacos na viabilidade de células H9c2 e HepG2 na ausência e presença de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Figura 7 -	Viabilidade de células HepG2 tratadas com fexinidazol-sulfona por 72 horas.....	40
Figura 8 -	Viabilidade de células HepG2 tratadas com fexinidazol-sulfona por 120 horas.....	41
Figura 9 -	Cinética da viabilidade de células HepG2 incubadas com fexinidazol-sulfona.....	42
Figura 10 -	Análise da proliferação de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de fexi-sulfona por tempo prolongado.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DC	Doença de Chagas
WHO	Organização Mundial de Saúde
Bz	Benznidazol
Nfx	Nifurtimox
Fexi-sulfona	Metabólito sulfona do fexinidazol
Amio	Amiodarona
Alo	Alopurinol
DMEM/F12	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium F12</i>
SFB	Soro fetal bovino
μM	Micromolar
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
VC	Viabilidade celular
SRB	Sulforodamina B
CPD	<i>Cumulative population doubling</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	15
2.2	TRATAMENTO ETIOLÓGICO.....	16
2.3	AMIODARONA, ALOPURINOL E FEXINIDAZOL.....	17
2.4	ESTUDOS SOBRE TOXICIDADE.....	18
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVO ESPECIFICA.....	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	CEPA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	22
4.2	FÁRMACOS.....	22
4.3	CULTURA CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	22
4.4	OBTENÇÃO DO PARASITO (TRIPOMASTIGOTAS).....	22
4.5	ENSAIOS CITOTOXICIDADE.....	23
4.5.1	Resazurina	24
4.5.2	Viabilidade celular com Sulforodamina B	25
4.5.3	<i>Cumulative Population Doubling (CPD)</i>	26
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	ANÁLISES DO TIPO CELULAR, TEMPO E INFECÇÃO COMO FATORES DE MODULAÇÃO DA TOXICIDADE.....	27
5.2	ENSAIO SULFORODAMINA B.....	39
5.3	CRESCIMENTO POPULACIONAL A LONGO PRAZO.....	43
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Muitos esforços têm sido realizados no sentido de encontrar alternativas terapêuticas à utilização do benznidazol e nifurtimox, os fármacos de referência no tratamento da doença de Chagas (Lidani *et al.*, 2019; Mazzeti *et al.*, 2021b). Ambos são pouco eficazes na fase crônica da infecção por *T. cruzi* e são administrados em esquemas posológicos longos, acompanhados da ocorrência de muitas reações adversas que diminuem significativamente a adesão ao tratamento (Müller Kratz *et al.*, 2018a; Pérez-Molina; Molina, 2018). Nesse cenário, o perfil do produto alvo (*Target Product Profile*) para o tratamento da doença de Chagas objetiva desenvolver um tratamento que seja administrado por via oral, com eficácia tripanossomicida, tolerabilidade e segurança, superiores aos fármacos de referência em ambas as fases da doença (DNDi, 2024).

Na busca por melhoria da eficácia, muitos avanços foram feitos nas últimas décadas, incluindo a avaliação de novos candidatos em estudos clínicos de fase II (Morillo *et al.*, 2017; Mazzeti *et al.*, 2021a; Torrico *et al.*, 2018, 2021; Pinazo *et al.*, 2024). Muito embora não tenham resultado na identificação de um tratamento adequado, esses estudos indicaram a necessidade de reavaliação dos modelos de avaliação pré-clínica (Chatelain; Scandale, 2020), e estimularam estudos que ampliaram a compreensão da biologia do parasito e interação parasito hospedeiro (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018). Como resultado, houve diversificação dos protocolos e modelos de avaliação pré-clínica da atividade anti- *T. cruzi* de novos candidatos. Particularmente, nos estudos *in vitro* tem sido demonstrada a necessidade de avaliação prolongada – na presença e após retirada dos compostos-teste, para averiguar a atividade tripanossomicida (Cal *et al.*, 2016; MacLean *et al.*, 2018)

No entanto, pouco tem sido discutido sobre os perfis de segurança de novos candidatos a fármacos. Um exemplo claro que ilustra a desconexão entre os estudos de eficácia e toxicidade é o fexinidazol, um fármaco recentemente aprovado como o primeiro tratamento oral para a tripanossomíase africana (Imran *et al.*, 2022) e submetido a estudos clínicos de fase 2 para tratamento da doença de Chagas, sendo até então o candidato mais avançado (Torrico *et al.*, 2023). Apesar de reduzir significativamente a carga parasitária, o fexinidazol induziu índices alarmantes de toxicidade hepática e neutropenia levando à descontinuação do tratamento em cerca de 30% dos pacientes (Torrico *et al.*, 2023). Curiosamente, esse perfil de toxicidade

não foi observado na terapêutica da tripanossomíase africana (Imran *et al.*, 2022) ou quando o fármaco foi administrado a indivíduos saudáveis, considerando a mesma posologia (Torrice *et al.*, 2023). Deste modo, é sugerido que a infecção por *T. cruzi* pode ser responsável e/ou atuar de maneira sinérgica a algum fator intrínseco dos hospedeiros no sentido de favorecer a toxicidade (Watson *et al.*, 2019a). Contudo, sendo um tratamento novo e restrito ao âmbito das tripanossomíases, os estudos na literatura acerca desses efeitos tóxicos do fexinidazol e suas relações com as respostas do hospedeiro à infecção são pouco explorados.

Outros fármacos de amplo uso clínico para diferentes condições, como o antiarrítmico amiodarona e o antigotoso alopurinol, foram avaliados, no contexto de reposicionamento, para o tratamento da doença de Chagas em avaliações pré-clínicas e clínicas (Avila; Avila, 1981; Gobbi *et al.*, 2007; Zahno *et al.*, 2011; Nacca *et al.*, 2012; Raviolo *et al.*, 2013; Mazzeti *et al.*, 2019; Terzo *et al.*, 2020). No entanto, dispõem de dados escassos acerca da toxicidade, particularmente no contexto da infecção pelo parasito *T. cruzi*.

Os estudos *in vitro* são muito relevantes, considerando as necessidades de redução da experimentação animal, para a compreensão básica do perfil e mecanismos de toxicidade de fármacos. Eles oferecem vantagens como a redução de tempo, custos e possibilitam a utilização de condições altamente controladas; no entanto, ainda são limitados, devido à inabilidade de mimetizar adequadamente as relações celulares e biológicas de sistemas e organismos completos (Algharably *et al.*, 2021). A infecção por *T. cruzi* oferece um cenário ainda mais desafiador; é um parasito que infecta diferentes tipos celulares hospedeiros, apresenta grande variabilidade genética e biológica e ainda infecta uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados (De Rycker *et al.*, 2018). Todas essas características permitem a construção de modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, muito diversos para *screening* de atividade e toxicidade de novas moléculas tripanossomicidas; no entanto, não há modelos adequados para avaliação de citotoxicidade, com valores preditivos validados disponíveis na literatura, sendo as análises utilizadas para garantir seletividade mínima (Romanha *et al.*, 2010; Kratz *et al.*, 2022) e desconsideram a presença da infecção e o tempo de tratamento.

Antecipar os efeitos de toxicidade é de enorme importância no desenvolvimento farmacológico para reduzir a taxa de atrito entre os experimentos (Madorran *et al.*, 2020). Neste contexto, no presente trabalho foi estudado o efeito dos parâmetros

tempo-dependência, concentração-dependência e infecção por *T. cruzi* no perfil de citotoxicidade de fármacos tripanossomicidas na presença ou ausência de infecção.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e endêmica na América Latina. Ela foi incluída pela Organização Mundial de Saúde entre as 20 doenças mais negligenciadas do mundo (WHO, 2023) e atualmente afeta mais de seis milhões de pessoas, especialmente aquelas em situações de vulnerabilidade econômica (Pérez-Molina; Molina, 2018).

A forma de transmissão vetorial é a principal forma de infecção, ocorrendo no momento do repasto sanguíneo de insetos reduvídeos da subfamília *Triatominae*, dos principais gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Pérez-Molina; Molina, 2018). Outras formas de transmissão envolvem vias de transfusão sanguínea ou de órgãos, via congênita, acidentes laboratoriais e via oral. Estratégias de combate à DC no Brasil alcançaram ótimos resultados no controle da transmissão vetorial e via transfusões (Ferreira; Silva, 2006), porém o mecanismo de infecção via oral vem ganhando destaque, por sua dificuldade de controle, falta de reconhecimento e novas estratégias de prevenção que se fazem necessárias (Coura, 2015; Lopez-Garcia; Gilabert, 2023). A infecção se dá principalmente pela ingestão de alimentos contaminados com o triatomíneo infectado, como caldo de cana ou açaí, adicionando mais um desafio para o controle da transmissão junto a alimentos (Coura, 2015).

T. cruzi é um parasito capaz de invadir qualquer tipo celular nucleado e diferentes cepas apresentam tropismo por células musculares, nervosas ou do sistema mononuclear (Andrade *et al.*, 1985). Ele possui três formas evolutivas durante seu ciclo: amastigota (forma reprodutiva intracelular), epimastigota (forma reprodutiva presente no intestino do invertebrado) e tripomastigota (forma infectante gerada a partir das amastigotas ou epimastigotas) (Pérez-Molina; Molina, 2018; Martín-Escolano *et al.*, 2022). A capacidade de infectar qualquer célula nucleada de mamífero, aliada às diferentes formas de transmissão, mostra a habilidade de sobrevivência de *T. cruzi* e sua capacidade de moldar-se a condições biológicas diversas.

As formas clínicas da DC são divididas em duas principais: aguda e crônica. A complexidade da resposta imune está ligada tanto ao controle do parasitismo quanto ao desenvolvimento de manifestações clínicas (Dutra; Gollob, 2008). Na fase aguda a resposta imune atua no controle do parasitismo, enquanto na fase crônica diferentes

tipos de respostas estão intimamente ligadas às futuras manifestações clínicas (Boscardin *et al.*, 2010). A fase aguda é caracterizada pela presença de tripomastigotas no sangue periférico e de intenso processo inflamatório (Bern, 2015). Esta fase dura cerca de dois meses e é geralmente assintomática, embora possa apresentar manifestações graves como meningoencefalite ou miocardite (Müller Kratz *et al.*, 2018a). Sem o tratamento etiológico, a DC avança para a fase crônica, a qual é simultânea com o estabelecimento de uma resposta imune eficiente, levando a diminuição da parasitemia em indivíduos imunocompetentes (Dutra; Gollob, 2008). E apesar dos níveis baixos de parasitemia, é durante essa fase que os sintomas mais graves podem acontecer. Enquanto a maioria dos indivíduos são assintomáticos nessa fase, denominando a forma clínica indeterminada, cerca de 30-40% desenvolvem forma sintomática da DC (Dutra; Gollob, 2008; Müller Kratz *et al.*, 2018a). A miocardite causada pela DC é a forma mais comum de cardiomiopatia e também a mais severa pela morbidade e mortalidade em pacientes (Bonney *et al.*, 2019).

2.2 TRATAMENTO ETIOLÓGICO

Há apenas dois medicamentos usados para o tratamento da doença, o benznidazol (Bz) (Benznidazol, LAFEPE) e o nifurtimox (Nfx) (Lampit[®], Bayer). Eles foram indicados no final da década 1960 para a fase aguda e crônica e permanecem como os únicos fármacos para tratamento para a DC (Lidani *et al.*, 2019).

Ambos são compostos nitroheterocíclicos e atuam como pró-fármacos, passando por ativação enzimática por nitroreduzases (Patterson; Wyllie, 2014). O Bz tem ação por meio de estresse redutivo envolvendo modificações covalentes em macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídeos (Docampo, 1990). Já o Nfx parece agir de forma diferente, sua redução leva a produção de metabólitos de oxigênio altamente tóxicos (Docampo, 1990; Urbina; Docampo, 2003). *T. cruzi* se mostrou deficiente nos mecanismos de desintoxicação de metabólitos de oxigênio, sendo, portanto sensível ao estresse oxidativo (Docampo, 1990; Urbina; Docampo, 2003).

Embora sejam usados há décadas, os fármacos provocam reações adversas importantes e não são bem tolerados pelos pacientes, levando a desistência do tratamento pelos pacientes (Pérez-Molina; Molina, 2018). O Bz apresenta menor frequência de efeitos colaterais em relação ao Nfx, sendo o medicamento referência no tratamento da DC no Brasil (Dias *et al.*, 2016).

Quanto à eficácia do tratamento, tanto para o Bz quanto o Nfx, o estágio da doença influencia na cura. Quando o tratamento é administrado durante a fase aguda, as chances de cura podem chegar a 90% (Bern, 2015). Durante a fase crônica, em crianças as taxas chegam a 60% e em adultos variam entre 15 e 30% (Hasslocher-Moreno *et al.*, 2012; Bern, 2015).

Assim, devido à baixa taxa de cura na fase crônica pelo fármaco referência somada aos efeitos colaterais que levam a descontinuidade da terapia, torna-se necessário a busca por novos tratamentos para a DC.

2.3 AMIODARONA, ALOPURINOL E FEXINIDAZOL

A fim de buscar novas alternativas de tratamento, estudos pré-clínicos têm identificado novos candidatos promissores (Mazzeti *et al.*, 2021a). A partir desses estudos, muitos deles de reposicionamento, os fármacos mais promissores seguiram para estudos clínicos (Mazzeti *et al.*, 2021a). Dentre esses compostos estão a amiodarona, alopurinol e, mais recentemente, o fexinidazol.

Amiodarona foi desenvolvida como um antianginoso na década de 60 (Singh, 1983) e é amplamente utilizada como forma de tratamento para arritmias em pacientes com DC atualmente (Stein *et al.*, 2018). Benaim *et al.* (2006) demonstraram que o fármaco tem efeito anti- *T. cruzi* e parece agir bloqueando a biossíntese de ergosterol, tendo efeito sinérgico quando combinado com posaconazol. Os mecanismos de ação contra o parasito envolveriam ainda alterações na homeostase de íons de reservas intracelulares (Benaim; Paniz-Mondolfi; Sordillo, 2021). Apesar de sua atividade, a amiodarona está associada a vários efeitos adversos (Zahno *et al.*, 2011; Nacca *et al.*, 2012; Terzo *et al.*, 2020). Portanto, melhorar a segurança da amiodarona e atividade parasitaria é necessário.

O reposicionamento de fármacos identificou também o alopurinol, um fármaco com resultados controversos. Essa droga, utilizada clinicamente como antigotoso, é análoga da hipoxantina e atua no substrato alternativo do fosforibosil transferase hipoxantina-guanina do *T. cruzi* (Marr; Berens; Nelson, 1978). A enzima pode incorporar alopurinol ao RNA do parasito, criando assim nucleotídeos não funcionais, bloqueio na síntese de purinas, afetando síntese proteínas e induzindo a morte do parasito (Marr; Berens; Nelson, 1978). Estudos demonstraram os benefícios do alopurinol de redução da parasitemia e atuação na fase aguda e crônica da DC em

camundongos (Avila; Avila, 1981; Gobbi *et al.*, 2007; Raviolo *et al.*, 2013). Porém, o trabalho de Mazzeti *et al.* (2019) mostrou que o alopurinol em monoterapia teve efeito menor ou nulo na parasitemia e na mortalidade do parasito.

O fexinidazol é um composto 5-nitroimidazol que apresentou excelente atividade pré-clínica em diferentes cepas de *T. cruzi* e foi recentemente aprovado para o tratamento oral da tripanossomíase africana (Bahia *et al.*, 2012; Deeks, 2019). Ele foi “redescoberto” pela DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*) após uma revisão sistemática e estudo do perfil de diversos compostos nitroheterocíclicos (Torreele *et al.*, 2010). Esse fármaco apresentou atividade anti-*T. cruzi in vivo* nas fases aguda e crônica da DC (Bahia *et al.*, 2012) e isso deve-se à rápida metabolização em sulfóxido e sulfona (Bahia *et al.*, 2014). Foi reportado que o fexinidazol promove desorganização maciça dos reservossomos, descolamento da membrana plasmática, desempacotamento da heterocromatina nuclear, edema mitocondrial, rompimento do Golgi e alterações no complexo cinetoplasto-mitocôndria do parasito (Zuma; De Souza, 2022). Considerando seus resultados promissores, um estudo de fase II foi conduzido na Bolívia, e apesar dos resultados promissores, o estudo teve que ser interrompido devido à segurança e tolerabilidade (Torrice *et al.*, 2023). O fexinidazol apesar de reduzir a carga parasitaria, mostrou efeitos alarmantes de toxicidade hepática e neutropenia, cerca de 30% dos pacientes descontinuaram o tratamento (Torrice *et al.*, 2023). Esse perfil de toxicidade do fexinidazol não foi observado na terapêutica da tripanossomíase africana ou quando administrado a indivíduos saudáveis (Imran *et al.*, 2022).

Efeitos tóxicos dessa classe de moléculas podem limitar seu uso, por isso estudos do potencial tóxico devem ser realizados (Mazzeti *et al.*, 2021a).

2.4 ESTUDOS SOBRE TOXICIDADE

Ensaio *in vitro* baseados em células com capacidade preditiva reduzem a dependência de modelos animais, agilizam a avaliação de moléculas candidatas e seus metabólitos, e facilitam a avaliação dos mecanismos de toxicidade, cinética e dose-resposta (Sirenko *et al.*, 2014). Contudo, mesmo com disponibilidade de uma ampla gama de tecnologias neste contexto, existe uma grande lacuna entre a pesquisa pré-clínica e clínica na avaliação de toxicidade de candidatos a fármacos. Os motivos para essa lacuna, que muitas vezes torna o processo de desenvolvimento

farmacológico ineficiente, relacionam-se, além da falta de compreensão integral sobre a fisiologia celular, no fato que a maior parte das pesquisas pré-clínicas é baseada em vias celulares específicas, enquanto a pesquisa clínica foca no monitoramento da homeostase (Madorran *et al.*, 2020). A maioria dos experimentos em modelos *in vitro* são conduzidos em um período de tempo limitado, não permitindo monitoramento contínuo e podendo levar a vieses. Dessa forma, uma dada substância pode induzir toxicidade para a célula em um dado momento e o dano ser reparado momentos depois, resultando em efeito não tóxico. Por outro lado, substâncias que não induzem toxicidade para a célula em um dado momento, podem fazê-lo após um período de acúmulo do estímulo (Rozman; Doull, 2000; Madorran *et al.*, 2020).

Mais especificamente no contexto da doença de Chagas, nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos, a citotoxicidade *in vitro* das moléculas é testada em ensaios que medem atividade metabólica das células viáveis ou por captação de corantes, enquanto a atividade antiparasitária pode ser aferida pelo número de parasitos viáveis no citoplasma da célula (Miranda *et al.*, 2015; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018). O *T. cruzi* é um parasito intracelular e qualquer atividade inibitória de uma molécula pode ser o resultado de dano celular após exposição ao composto. Nesse sentido, um ensaio ideal deveria avaliar a citotoxicidade usando células alvo do parasito infectadas pelo parasito, de forma a se garantir que a atividade antiparasitária não envolva alterações não desejadas nas células hospedeiras (Miranda *et al.*, 2015). Para estabelecer se essa relação é verdadeira, é calculado o valor do índice de seletividade, que considera a CC-50 (concentração tóxica para 50% das células hospedeiras) e IC-50 (concentração tóxica para 50% dos parasitos) e é um preditor da janela terapêutica do fármaco (Miranda *et al.*, 2015).

Embora esse seja o cenário desejável e haja atualmente tecnologias que permitam triar simultaneamente a toxicidade para células e parasitos em uma única plataforma (Alonso-Padilla *et al.*, 2015), a maior parte dos estudos de *screening* da atividade tripanossomicida de novas moléculas não contempla ensaios em células na presença do parasitismo ou mesmo utiliza células alvo do parasito. Adicionalmente, existe uma dificuldade de harmonizar protocolos básicos para avaliação de toxicidade, visto que o parasito tem uma grande capacidade de infectar grande variedade de células nucleadas, oferecendo inúmeras possibilidades de modelos experimentais que incluem linhagens, culturas primárias, células fagocíticas ou não. Como consequência, mesmo para os fármacos de referência, não existem valores padrão de toxicidade *in*

vitro.

A linhagem celular de cardiomiócitos H9c2 é uma sublinhagem derivada da linhagem celular clonal original BD1X, que foi obtida a partir de tecido embrionário do coração de rato (Kimes; Brandt, 1976). É utilizada em estudos *in vitro*, particularmente em análises de cardiotoxicidade de novos fármacos (Witek *et al.*, 2016).

As células HepG2 foram listadas no repositório ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA), como uma linhagem celular humana originada a partir de tecido hepático de uma homem branco de 15 anos com um carcinoma hepatocelular bem diferenciado (López-Terrada *et al.*, 2009). Acredita-se que elas mantenham grande parte das funções metabólicas de um hepatócito normal, por isso seu uso se popularizou em estudos de efeitos tóxicos (Schoonen *et al.*, 2005; Kamalian *et al.*, 2015). A lesão hepática induzida por fármacos é uma das principais causas de falha de candidatos a fármacos em testes pré-clínicos e clínicos e também é uma das razões mais frequentes para a suspensão de fármacos aprovados (Corsini *et al.*, 2012).

Conhecer o perfil de citotoxicidade dos fármacos fexinidazol-sulfona, nifurtimox, amiodarona e alopurinol em diferentes tipos celulares e tempos de tratamento é necessário, uma vez que é escassa literatura relacionada ao tema. Somado a isso, questionar se infecção por *T. cruzi* afeta a citotoxicidade de fármacos *in vitro* é pertinente, especialmente considerando que o fexinidazol apresentou um perfil tóxico em pacientes infectados por *T. cruzi* e não na infecção por *T. brucei gambiense* (Imran *et al.*, 2022; Torrico *et al.*, 2023). Nesse sentido, explorar aspectos da interação patógeno-hospedeiro-fármaco que permitam identificar de forma mais assertiva o potencial citotóxico de candidatos a fármacos contra DC são essenciais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Explorar o perfil de toxicidade de fármacos tripanossomicidas na ausência e presença de infecção por *T. cruzi* em modelo de estudo *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do tipo celular hospedeiro no perfil de toxicidade dos fármacos fexinidazol sulfona, nifurtimox, amiodarona e alopurinol;
- Investigar o impacto da infecção com a cepa Y de *T. cruzi* na viabilidade das células submetidas ao tratamento com os fármacos;
- Identificar a relevância dos parâmetros concentração e tempo de tratamento no perfil de toxicidade dos fármacos;
- Explorar o efeito da incubação prolongada com fexinidazol-sulfona na viabilidade e proliferação de células HepG2.

4 METODOLOGIA

4.1 CEPA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*. Essa cepa, descrita em 1953 por Silva & Nussenzweig, é mantida em laboratório por meio de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos. A cepa Y é considerada parcialmente sensível ao benznidazol e ao nifurtimox (Filardi; Brener, 1987).

4.2 FÁRMACOS

Quadro 1 – Fármacos

benznidazol (Bz)	N-benzil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Lafepe, usado como fármaco de referência
nifurtimox (Nfx)	(E)-N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitrofurano-2-il)metanimina
amiodarona (Amio)	(2-butil-1-benzofuran-3-il)-[4-[2-(dietilamino)etoxi]-3,5-diiodofenil]metanona
alopurinol (Alo)	1,5-di-hidropirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona
metabólito fexinidazol-sulfona (fexi-sulfona)	1-metil-2 - [(4-metilsulfonilfenoxi) metil] -5-nitroimidazol

Fonte: autora

4.3 CULTURA CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As células da linhagem HepG2 e H9c2 foram mantidas em *Dulbecco Modified Eagle Medium* F12 (DMEM/F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina, a 37°C e 5% CO₂ e subculturas foram feitas regularmente a cada 2 ou 3 dias (Moraes; Diniz; Bahia, 2015).

4.4 OBTENÇÃO DO PARASITO (TRIPOMASTIGOTAS)

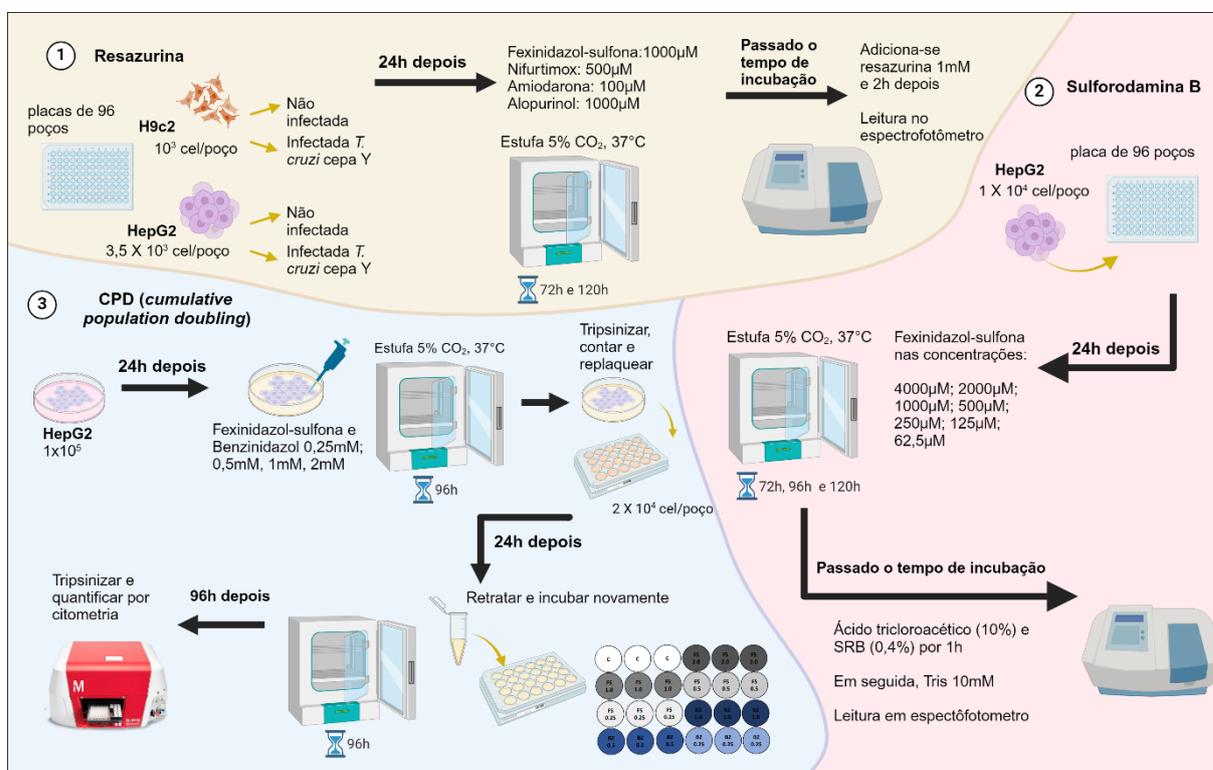
As formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas a partir do sobrenadante de células de cultura (H9c2) com tripomastigotas sanguíneos de camundongos no pico

da parasitemia. Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ das células com os tripomastigotas sanguíneos, o meio de cultura foi removido e lavado com PBS sucessivas vezes com intuito de remover os tripomastigotas não internalizados. As células foram novamente incubadas e após 72 horas de incubação nas mesmas condições, o sobrenadante foi centrifugado a 1000rpm por 5 minutos para separação das células de mamíferos e debris. O sobrenadante rico em tripomastigotas foi então centrifugado a 3500rpm a 4°C por 15 minutos. Os parasitos presentes no precipitado foram ressuspensos em meio de cultura e quantificados em câmara de Neubauer para a posterior utilização (Diniz *et al.*, 2018).

4.5 ENSAIOS CITOTOXICIDADE

A figura 1 apresenta um *graphical abstract* dos ensaios realizados de modo a facilitar o entendimento dos procedimentos.

Figura 1 - *Graphical abstract* dos ensaios realizados para averiguar citotoxicidade dos fármacos tripanossomicidas



Fonte: Autora.

Legenda: O *graphical abstract* apresenta de forma sumarizada a metodologia de cada ensaio. Em 1 o ensaio de viabilidade utilizando resazurina. Foram usados os tipos celulares H9c2 e HepG2 na presença ou ausência de infecção por *T. cruzi* cepa Y e nos tempos de 72 horas e 120

horas. Os fármacos, bem como suas concentrações máximas, são apresentados. Após incubação, foi adicionado o corante e feito a leitura. Em 2 os ensaios para verificar viabilidade celular utilizando sulforodamina B, no qual utilizou-se apenas do tipo celular HepG2 e o fármaco fexinidazol-sulfona em diferentes concentrações. Após os tempos de incubação, de 72 horas, 96 horas e 120 horas, adicionou-se o ácido tricloroacético e a sulforodamina B. Passado 1 hora, retirou-se o excesso, o Tris foi adicionado e a leitura foi realizada. Em 3 o ensaio pelo método CPD foi feito usando também apenas as células do tipo HepG2 e o fármaco fexinidazol-sulfona e benznidazol em diferentes concentrações. Passado o tempo de incubação de 96 horas, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas em uma placa de 24 poços. Após 24 horas, a pressão do fármaco é adicionada novamente e a placa é incubada por mais 96 horas. A leitura é feita após esse período por citometria de fluxo.

4.5.1. Resazurina

Para avaliar os efeitos tóxicos dos fármacos e o impacto do tempo de incubação, presença de infecção ou tipo celular, as culturas de células H9c2 e HepG2 foram infectadas ou não e tratadas com concentrações decrescentes de fexinidazol-sulfona, nifurtimox, amiodarona e alopurinol por 72 horas ou 120 horas e posteriormente a viabilidade celular foi quantificada. Duzentos microlitros de suspensão das células H9c2 e HepG2, nas concentrações de 10^3 cel/poço e $3,5 \times 10^3$ cel/poço respectivamente, foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°C , 5% CO_2 . A seguir, as formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi* na proporção de 1:1 parasitos para células hospedeira foram adicionados ou não e incubados nas mesmas condições. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e substituído por 200 μL de meio contendo ou não os fármacos: Fexi-sulfona (a partir de 1000 μM), Nfx (a partir de 500 μM), Amio (a partir de 100 μM) e Alo (a partir de 1000 μM). Foram avaliadas seis diluições seriadas 1:2.

Após 72h de incubação, em quatro placas (H9c2 infectada, H9c2 não infectada, HepG2 infectada, HepG2 não infectada) foi removido o meio de cultura e adicionado novamente meio com fármacos, estas retornaram para a estufa de CO_2 . Com as outras placas nas mesmas condições foram removidas o meio e adicionado em todos os poços 200 μL de meio de cultura contendo 20 μL de resazurina 1mM. Decorridas 4 horas de incubação, a 37°C , as placas foram lidas em leitor de microplacas (570nm e 600nm). Após 120 horas de tratamento, as placas remanescentes passaram pelo mesmo processo com a resazurina e foram lidas em leitor de microplacas. No ensaio foram incluídos controles negativos (meio + resazurina), positivos (meio + células); controle do potencial de redução de células infectadas (meio + células + tripomastigotas) e ainda controle de morte celular (DMSO) com diferentes concentrações de DMSO: 1%, e 20%. O percentual de inibição da proliferação celular

induzida pelos fármacos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VC = 100 - \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ tratado}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0) C_+} \times 100$$

Sendo, A_{570} a Absorbância a 570nm, A_{600} a Absorbância a 600nm, C_+ é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência do fármaco. R_0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C_-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células.

$$R_0 = \frac{A_{570}}{A_{600}} C_-$$

A absorbância do meio de cultura foi subtraída de todas as amostras (meio na ausência de resazurina).

Todas as avaliações *in vitro* foram realizadas no mínimo três vezes e utilizando três replicatas.

4.5.2 Viabilidade celular com Sulforodamina B

Outra forma de determinar viabilidade celular foi pelo ensaio de Sulforodamina B (SRB), de acordo com Vichai e Kirtikara (2006). As células foram semeadas em placas de 96 poços com inóculo de 1×10^4 cel/poço. Após adesão (24 horas), as culturas foram tratadas por 72, 96 e 120 horas com fexi-sulfona nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μ M. Ao final do tempo de tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (10%) e coradas com SRB (0,4%) por uma hora. O excesso da SRB foi removido por lavagens com ácido acético (1%). Após secagem, a SRB foi solubilizada em solução de Tris (10 mM) e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm com referência de 690. A viabilidade celular (%) foi determinada pela equação:

$$VC = \frac{AbsT \times 100}{AbsC}$$

Sendo, $AbsT$ às absorbâncias dos grupos tratados e $AbsC$ às absorbâncias do controle não tratado. Os valores apresentados referem-se a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes.

4.5.3 **Cumulative Population Doubling (CPD)**

Para análise do crescimento populacional a longo prazo foi utilizada a determinação da *cumulative population doubling* (CPD) proposta por Silva *et al.* (2016). Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 35 mm com inóculo de 1×10^5 células HepG2 por placa. Após adesão, as culturas foram tratadas por 96 horas com benznidazol ou fexi-sulfona nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 mM. Decorridas as primeiras 96 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, contadas em hemocítômetro e replaqueadas em placas de 24 poços com inóculo de 2×10^4 células por poço. Após adesão, as culturas foram retratadas e mantidas por mais 96 horas. As culturas foram tratadas por 192 horas (8 dias) e a cada 48 horas o tratamento foi renovado. No final do tratamento, as células foram quantificadas por citometria de fluxo (*Guava Mini EasyCyte*, 8HT) por meio do software *GuavaSoft 2.7*. CPD foi determinado pela equação:

$$CPD = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

Onde, N corresponde ao número de células quantificadas após 96 e 192 horas de exposição ao tratamento com fexi-sulfona e benznidazol e N_0 corresponde ao inóculo inicial de células.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram apresentados como média \pm SD. As comparações entre os diferentes tipos celulares, tempo de tratamento e infecção foram feitos por teste t não pareado corrigido para múltiplas comparações usando o método Holm-Sidak no software *Graphpad Prism 8.0*. Para comparação de dois grupos de dados foi utilizado teste t não pareado. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Os valores de CC-50 foram determinados por meio do software *CompuSyn*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DO TIPO CELULAR, TEMPO E INFECÇÃO COMO FATORES DE MODULAÇÃO DA TOXICIDADE

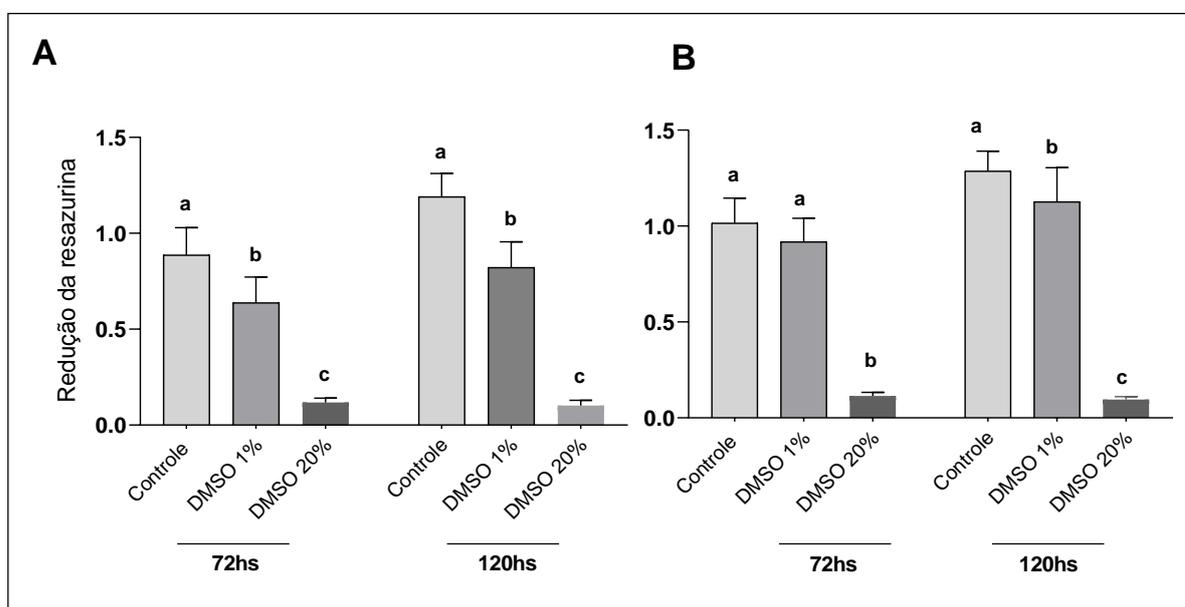
Estudos sobre toxicidade são importantes, uma vez que eles permitem antecipação de efeitos nocivos que um determinado fármaco possa desempenhar no organismo dos pacientes (Espíndola *et al.*, 2022). O perfil de citotoxicidade de fármacos tripanossomicidas é um importante parâmetro a ser avaliado no processo de desenvolvimento farmacológico, especialmente considerando que o tratamento eficaz para a doença de Chagas pressupõe a eliminação das formas amastigotas do parasito, as quais localizam-se no interior das células nucleadas de mamíferos. No entanto, pouco tem sido discutido sobre a influência do tipo celular hospedeiro, tempo de tratamento ou infecção por *T. cruzi* no perfil de citotoxicidade dos fármacos já em fase avançada de avaliação e mesmo para aqueles de uso clínico (Dantas; Torres-Santos; Silva Jr, 2022).

No presente estudo buscamos explorar, sob diferentes condições experimentais, os efeitos citotóxicos de fármacos que apresentam ação anti- *T. cruzi*. A escolha dos fármacos utilizados foi pautada na literatura; o nifurtimox e benznidazol são os fármacos de referência para o tratamento da DC e os demais (fexinidazol-sulfona, amiodarona e alopurinol) são candidatos que chegaram a estágios avançados de avaliação pré-clínica e clínica da DC (Avila; Avila, 1981; Gobbi *et al.*, 2007; Zahno *et al.*, 2011; Nacca *et al.*, 2012; Raviolo *et al.*, 2013; Mazzeti *et al.*, 2019; Terzo *et al.*, 2020). É especialmente destacado o fexi-sulfona uma vez que esse fármaco apresentou recentemente ótimos resultados em estudos pré-clínicos de atividade anti- *T. cruzi* (Bahia *et al.*, 2012, 2014), e eficácia na fase crônica da doença de Chagas humana, porém com perfil de toxicidade clínica alarmante (Torrice *et al.*, 2023) e não detectada anteriormente nas avaliações pré-clínicas. A análise desse desfecho é ainda incipiente na literatura e impulsiona nosso estudo.

Neste contexto, foi avaliado, para cada fármaco, o impacto do tipo celular hospedeiro – H9c2 ou HepG2; da presença da infecção por *T. cruzi* - cepa Y; e do tempo de tratamento – 72h ou 120h, no perfil de toxicidade para as células hospedeiras. Contudo, previamente à avaliação dos fármacos, buscamos compreender o efeito do solvente utilizado, o DMSO, na viabilidade dos diferentes

tipos celulares considerando o indicador de viabilidade utilizado, a resazurina. A Figura 2A mostra que houve redução significativa na capacidade de metabolização da resazurina pelas células H9c2 na presença de DMSO 1%, a maior concentração de uso praticada, sendo esse efeito mais pronunciado com o aumento do tempo de incubação. Já para as células HepG2 a influência foi menor, sendo observada interferência apenas com 120 horas de exposição (Figura 2B). Para a concentração de 20% de DMSO, usada como controle de toxicidade, a viabilidade das células foi reduzida em mais de 90%, independente do tempo ou do tipo celular (Figura 2).

Figura 2 – Efeito do DMSO na viabilidade das células HepG2 e H9c2.



Fonte: Autora.

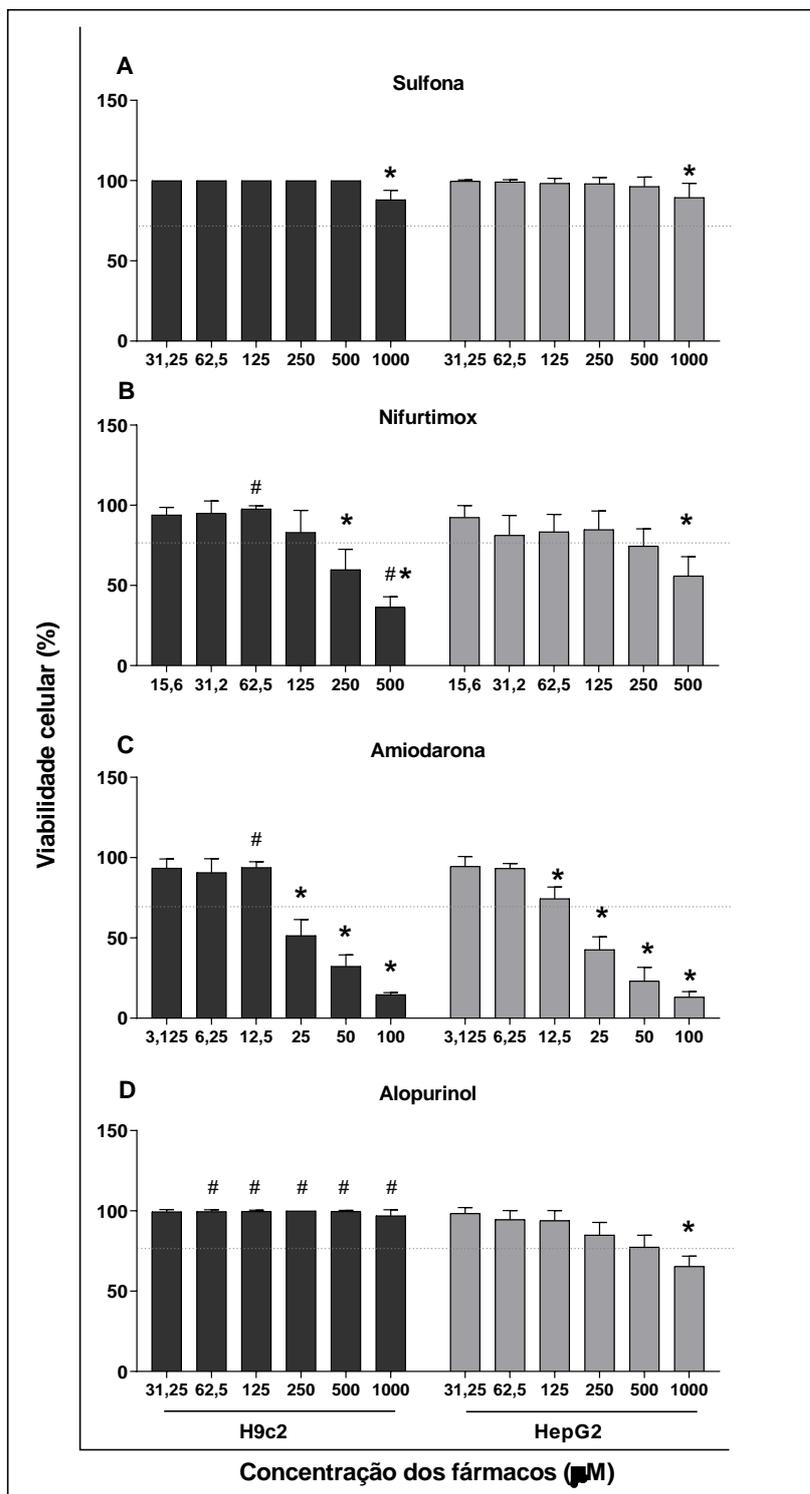
Legenda: Avaliação da influência do DMSO na viabilidade de células. Resultado estabelecido a partir da redução da resazurina. Em A células do tipo H9c2 tratadas ou não com DMSO por 72h e 120h. Em B células do tipo HepG2 tratadas ou não com DMSO por 72h ou 120h. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os dados sobre o impacto do DMSO no perfil de toxicidade de fármacos são diversos na literatura; Costa *et al.* (2017) observaram que DMSO a 2,5% v/v não modifica a viabilidade de linfócitos, no entanto, de 1% a 2% reduz o índice de proliferação dessas células. Moskot *et al.* (2019) trabalhando com fibroblastos dérmicos, mostraram que o efeito do DMSO na redução da viabilidade da cultura é tempo e concentração-dependente. Quando a 1% por 48 horas de exposição, não houve efeito significativo. No entanto, após 7 dias, a proliferação das células foi reduzida em 57% (Moskot *et al.*, 2019). Considerando ainda os resultados obtidos em

nosso estudo, a interferência do solvente foi considerada nos cálculos do percentual de inibição da viabilidade celular dos fármacos, de forma a excluir um potencial efeito citotóxico do DMSO de forma independente dos fármacos.

A Figura 3 mostra o percentual de viabilidade das células H9c2 e HepG2 resultante da incubação por 72 horas com os fármacos fexinidazol-sulfona, nifurtimox, amiodarona e alopurinol. Observa-se que apenas a maior concentração de fexinidazol-sulfona interferiu significativamente na viabilidade de ambos os tipos celulares (Figura 3A); contudo, níveis de viabilidade maiores que 70% foram ainda observados. Já o nifurtimox apresentou efeito concentração-dependente e foi mais citotóxico para H9c2 do que para HepG2, consideradas as maiores concentrações (Figura 3B). De forma diferente, a amiodarona induziu altos níveis de inibição da viabilidade celular em ambos os tipos celulares (Figura 3C), sendo a linhagem HepG2 mais susceptível ao efeito citotóxico. Perfil similar foi observado para o alopurinol; o fármaco foi incapaz de interferir na viabilidade das células H9c2, sendo significativamente mais tóxico para as células HepG2, particularmente nas concentrações de 500 μM e 1000 μM (Figura 3D).

Figura 3 – Impacto do tipo celular no perfil de citotoxicidade dos fármacos tripanossomicidas.



Fonte: Autora.

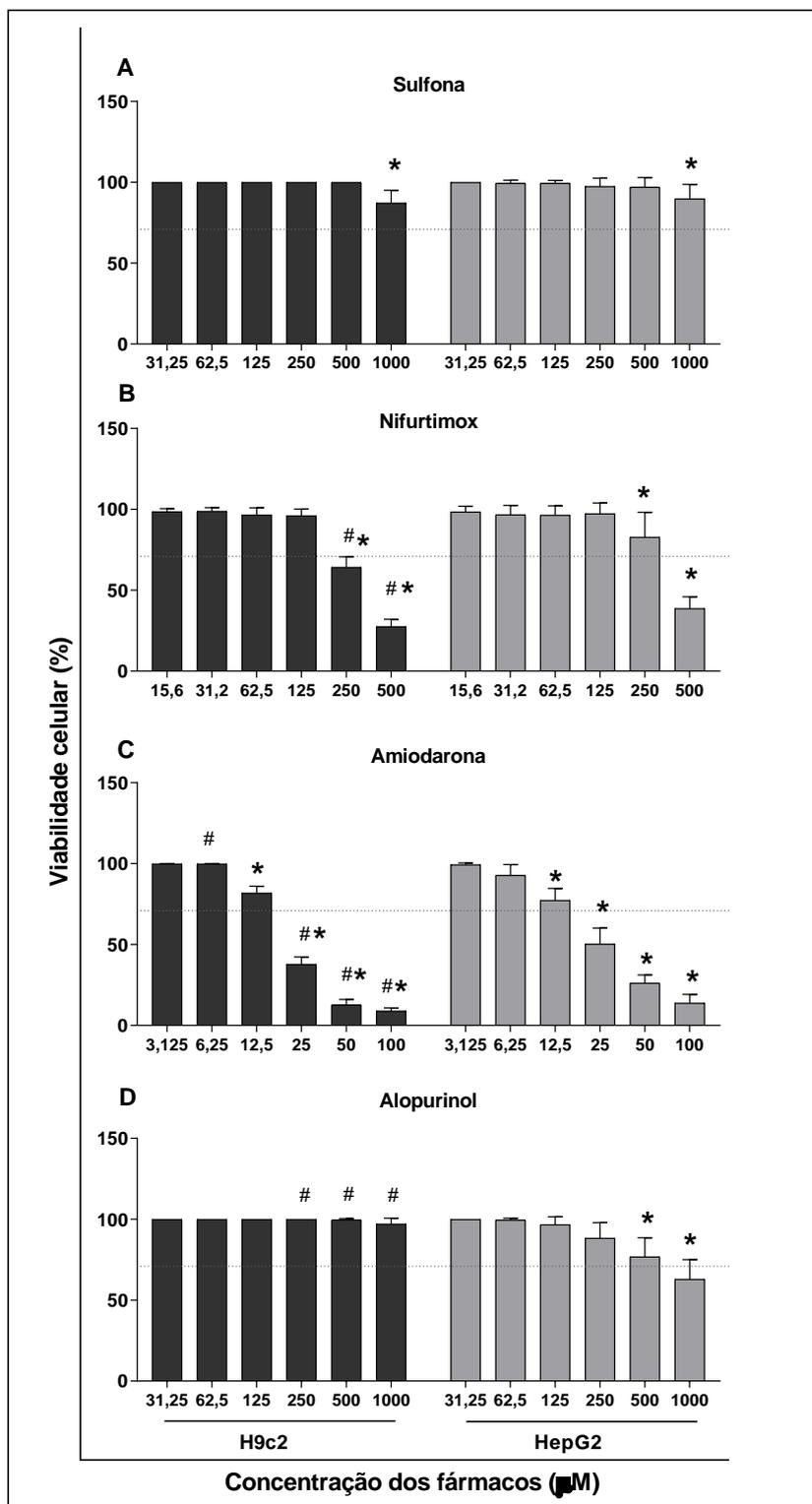
Legenda: Células H9c2 e HepG2 foram incubadas por 72 horas com os fármacos. O percentual de viabilidade celular comparativamente ao controle foi estabelecido por meio da redução da resazurina. As colunas em preto são relativas as células tipo H9c2 e em cinza células tipo HepG2. Todas as avaliações foram realizadas no mínimo três vezes e utilizando três replicatas. As linhas no nível 70% indicam o ponto de corte para toxicidade; viabilidade menor que 70% foram considerados efeito citotóxico, de acordo com ISO 10993-5 (2009). #

representam diferença estatística comparativamente ao tempo de 120 horas; * representa diferença estatística em comparação à concentração imediatamente anterior. ($p < 0,05$).

Nas condições experimentais utilizadas, o tipo celular hospedeiro influenciou no perfil de toxicidade de forma dependente do fármaco (Figura 3), o que deve guardar relação com o mecanismo de ação de cada um deles e a fisiologia dos diferentes tipos celulares – um cardiomiócito e um hepatócito. Essas células foram usadas por apresentarem-se como células: I) alvo do parasito - a linhagem H9c2 é derivada de tecido embrionário de coração de rato e usada em estudo sobre cardiotoxicidade (Witek *et al.*, 2016), ou II) devido ao seu amplo uso na literatura sobre toxicidade hepática - HepG2 é uma linhagem celular humana originada a partir de tecido hepático (Schoonen *et al.*, 2005; Kamalian *et al.*, 2015).

O tempo de incubação de 72h foi escolhido considerando o que é amplamente praticado na literatura científica acerca da avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de novas moléculas (Bahia *et al.*, 2014; Mazzeti *et al.*, 2021b; Zuma; De Souza, 2022). Contudo, sabe-se também que períodos prolongados de tratamento são necessários para efetivamente eliminar as formas amastigotas intracelulares, particularmente considerando as formas dormentes do parasito (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018). Na expectativa de verificar se o aumento do tempo de exposição interferiria de forma cumulativa na viabilidade dos diferentes tipos celulares, as células foram expostas a 120 horas de incubação com as mesmas concentrações dos fármacos. A Figura 4 mostra, para os diferentes tipos celulares, os efeitos na proliferação resultantes da incubação por 120 horas. De forma geral, não houve alteração expressiva; foi observado para fexinidazol-sulfona e alopurinol perfil similar ao observado com 72 horas (Figuras 4A e 4D, respectivamente). O nifurtimox, na maior concentração, foi ligeiramente mais tóxico para as HepG2 e H9c2 (Figura 4B), enquanto a amiodarona reduziu ainda mais a viabilidade do cardiomiócito, sobretudo nas maiores concentrações (Figura 4C).

Figura 4 – Impacto do tipo celular hospedeiro no perfil de citotoxicidade dos fármacos tripanossomicidas sob exposição prolongada.



Fonte: Autora.

Legenda: Células H9c2 e HepG2 foram incubadas por 120 horas com os fármacos. O percentual de viabilidade celular comparativamente ao controle foi estabelecido por meio de resazurina. As colunas em preto são relativas as células tipo H9c2 e em cinza células tipo HepG2. Todas as avaliações foram realizadas no mínimo três vezes e utilizando três replicatas. As linhas no nível 70% indicam o ponto de corte para toxicidade; viabilidade menor que 70% foram

considerados efeito citotóxico, de acordo com ISO 10993-5 (2009). # representam diferença estatística comparativamente ao tempo de 120 horas; * representa diferença estatística em comparação à concentração imediatamente anterior. ($p < 0,05$).

Em relação aos valores de toxicidade dos fármacos estudados em ambos os tempos de exposição, nossos dados sobre o fexi-sulfona são corroborados por Bahia *et al.* (2014), que não observaram alteração na viabilidade de macrófagos peritoneais tratados com ambos os metabólitos do fexinidazol (sulfona e sulfóxido até $120\mu\text{M}$), enquanto a EC-50 sobre formas intracelulares do parasito foram em torno de $5\mu\text{M}$. Por outro lado, Zuma e De Souza (2022) relataram drástica redução de células viáveis (59% e 70%) com concentrações de $100\mu\text{M}$ e $200\mu\text{M}$ de fexinidazol, respectivamente. Nesse caso não foram avaliados os metabólitos e os autores utilizaram células LLC-MK₂ (Zuma e De Souza, 2022). Ainda, não foram relatados no referido o impacto das concentrações de DMSO utilizadas, o que seria de grande importância, especialmente tendo em conta a baixíssima solubilidade do fexinidazol. Em nosso estudo, inicialmente foi incluído o fexinidazol; contudo, o fármaco não interferiu na viabilidade de ambos os tipos celulares (dados não mostrados) e, considerando que se trata de um pró-fármaco que é biotransformado *in vivo*, sendo o fexinidazol-sulfona o metabólito majoritário, optamos por incluir apenas o estudo do metabólito. Curiosamente, apesar da recente aprovação do uso do fexinidazol para tratamento da tripanossomíase africana, do potencial para uso na doença de Chagas e os diversos estudos no âmbito da terapêutica das leishmanioses (De Moraes-Teixeira; Rabello; Aguiar, 2019; Wyllie *et al.*, 2012; Damasio *et al.*, 2023) os artigos não relatam a toxicidade *in vitro* do fexinidazol ou seus metabólitos. Dessa forma, são escassas as comparações que podem ser feitas no âmbito da toxicidade *in vitro* dessas moléculas.

Já a amiodarona apresentou perfil inverso ao fexinidazol-sulfona, com valores de CC-50 na faixa *low* micromolar. Esse fármaco é um potente antiarrítmico, tem indicação restrita a casos graves de arritmias ventriculares devido aos altos índices de efeitos colaterais graves que induz, envolvendo coração, pulmões, fígado e o sistema nervoso central (Algharably *et al.*, 2021). É de uso clínico para pacientes com formas arrítmicas da cardiopatia chagásica crônica, apresenta efeito tripanossomicida também em escala micromolar (Benaim; Paniz-Mondolfi; Sordillo, 2021) e tem efeito sinérgico quando utilizado com outros fármacos anti-*T. cruzi*, sugerido como potencial alternativa ao tratamento da doença de Chagas (Benaim; Paniz Mondolfi, 2012; Benaim; Paniz-Mondolfi; Sordillo, 2020). São disponíveis na literatura dados sobre os

efeitos deletérios na viabilidade de células de mamíferos - 75 a 200 μ M (Chiovato *et al.*, 1994), mas escassos os estudos que tratam da citotoxicidade no contexto da infecção por *T. cruzi*. Adesse *et al.* (2011) mostraram, em cardiomiócitos primários cultivados *in vitro*, que a amiodarona não induzia efeitos tóxicos até a concentração de 10 μ M. Barbosa *et al.* (2022) mostraram redução de 20% na viabilidade utilizando a mesma concentração, estando ambos os trabalhos em consonância com os dados que foram obtidos em nosso estudo (Figuras 3 e 4).

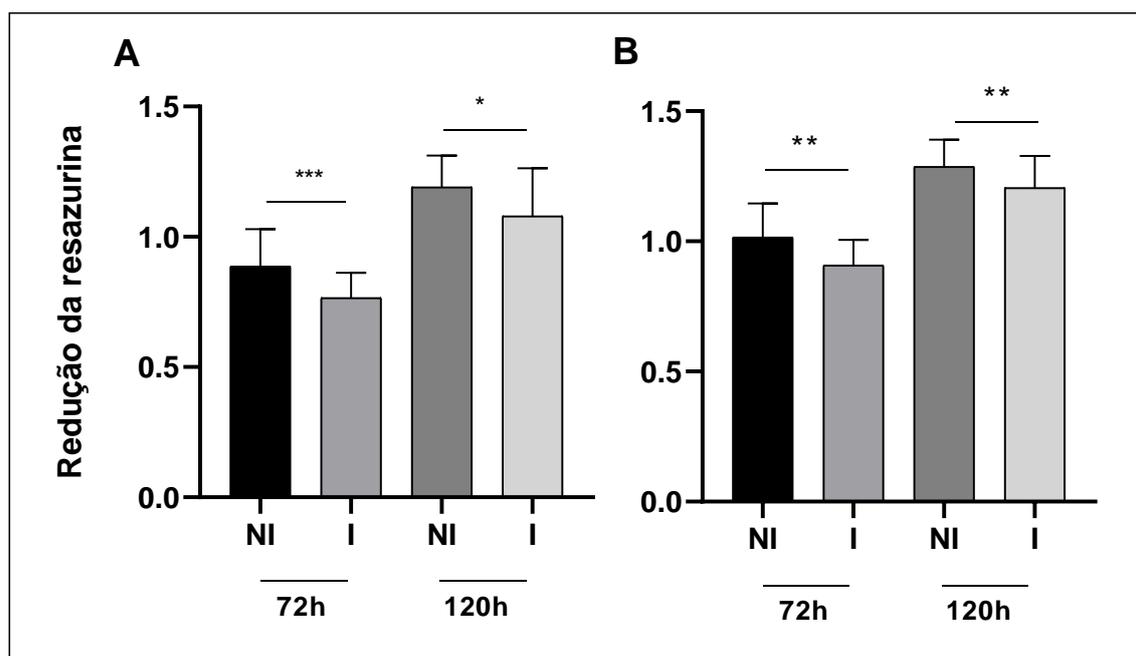
Da mesma forma, o alopurinol, apesar de avaliado pré-clínica e clinicamente no tratamento da infecção por *T. cruzi*, dispõe de dados limitados sobre o perfil de toxicidade *in vitro*. Esse fármaco, amplamente utilizado para reduzir os níveis de ácido úrico, não é relacionado a efeitos adversos graves habitualmente, sendo a intolerância gastrointestinal e efeitos dérmicos os mais comumente relatados (Sosa; Gallerano; Marr, 1990). Com relação aos valores considerando células de mamíferos no contexto *in vitro*, Mazzeti *et al.* (2019) observaram a inibição da viabilidade de 25% com o uso de 1mM de alopurinol por 72 horas sobre células H9c2 (Mazzeti *et al.*, 2019), enquanto Alonso-Padilla *et al.* (2015) relataram CC-50 maior que 100 μ M. Em nosso estudo, foram vistos perfis diferentes de efeito a depender do tipo celular, sendo as células HepG2 mais susceptíveis à redução da viabilidade causada pela exposição ao alopurinol, enquanto sobre H9c2 nenhuma redução da viabilidade foi observada (Figuras 3 e 4). Este resultado provavelmente reflete as diferenças entre a fisiologia dos dois tipos celulares utilizados.

A infecção por *T. cruzi* leva a uma série de alterações nas células hospedeiras, relacionadas a arranjos no citoesqueleto (Ferreira *et al.*, 2021); expressão de proteínas (Fenton; Jongens; Holzbaur, 2021), dentre outras. Dessa forma, é importante conhecer o perfil de toxicidade no contexto da infecção pelo parasito, já que as células podem estar mais ou menos vulneráveis. Contudo, os dados da literatura, em geral, não avaliam a citotoxicidade para as células hospedeiras infectadas por *T. cruzi*. As análises de toxicidade são geralmente feitas utilizando células saudáveis incubadas com os fármacos (Romanha *et al.*, 2010) e o índice de seletividade é calculado a partir da razão entre concentração ativa sobre o parasito (células infectadas) e concentração tóxica para células não infectadas, o que poderia levar a vieses.

Com o objetivo de verificar se a infecção isoladamente interferiria na viabilidade celular, foi investigado o efeito do parasitismo por *T. cruzi* na capacidade de redução

do corante pelas células hospedeiras. Utilizamos a cepa Y como nosso modelo, por um período de interação de 24 horas, seguidos por 72 ou 120 horas de incubação. A Figura 5 mostra que a infecção interferiu significativamente na metabolização do corante por ambos os tipos celulares nos dois períodos avaliados.

Figura 5 – Avaliação da interferência da infecção por *Trypanosoma cruzi* na viabilidade celular.



Fonte: Autora.

Legenda: Níveis de redução da resazurina nas células controle (NI) e infectadas (I) pela cepa Y de *T. cruzi* e mantidas por 72h e 120 h. Em A células do tipo H9c2 e B células do tipo HepG2. * representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Para explicar o menor percentual de redução observado nas células infectadas, o que não era esperado, devido à presença de amastigotas intracelulares, deve ser considerado que o ciclo intracelular da cepa de *T. cruzi* utilizada tem a duração aproximada de 96 horas. Assim, somado o tempo de interação (24h) aos tempos de tratamento avaliados (72h e 120h), as células tinham o tempo de infecção de 96 e 144 horas, respectivamente. Dessa forma, na ausência de tratamento etiológico, o parasitismo intracelular leva a alterações na ultraestrutura das células e, por fim à lise, com o objetivo de liberar as formas tripomastigotas para o meio externo, o que pode ser sugerido como causa na redução da viabilidade das culturas observada. Contudo, como foram utilizadas linhagens celulares, as células não infectadas, viáveis,

continuam a proliferar, o que justifica um maior número de células viáveis mesmos nos grupos infectados, quando se compara os tempos 72h e 120h. Muito embora haja trabalhos na literatura demonstrando a aplicação do ensaio de resazurina sobre formas epimastigotas (Rolón *et al.*, 2006) e tripomastigotas (De Freitas Oliveira *et al.*, 2021, 2022), não há descrição sobre o perfil de redução da resazurina em amastigotas intracelulares.

A seguir foi então checada a viabilidade das células hospedeiras, infectadas ou não, na presença dos fármacos. A Figura 6 mostra as curvas de concentração-resposta resultantes da incubação com cada fármaco por 72h e 120h em células infectadas comparativamente às não infectadas. A Tabela 1 sumariza os dados de viabilidade nas diferentes condições, empregando resazurina.

A Figura 6A e B mostram que, para fexinidazol-sulfona, a infecção levou à redução significativa dos níveis de viabilidade de ambos os tipos celulares, no período de 120h para H9c2 e 72h para HepG2. Contudo, os níveis ainda foram maiores que 70%, mostrando que não houve citotoxicidade. Para os demais fármacos, de forma geral, apesar de alterações pontuais na viabilidade – particularmente em HepG2 tratada com nifurtimox e alopurinol, não houve alteração dos perfis das curvas de concentração-efeito resultantes da exposição das células infectadas comparativamente às não infectadas (Figura 6C a H).

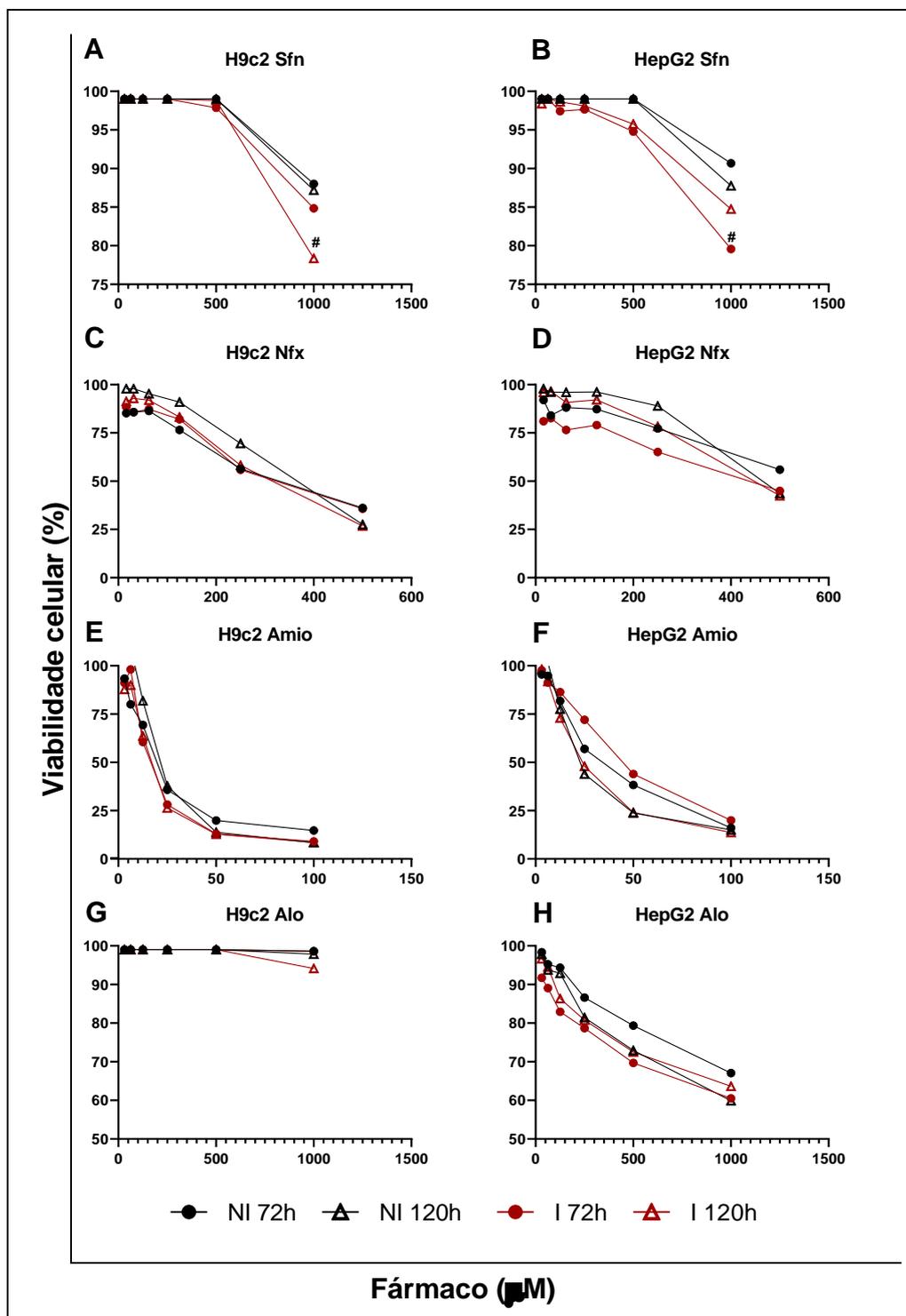
Tabela 1 - Influência do tipo celular, infecção por *T. cruzi* e tempo de exposição no perfil de toxicidade de fexi-sulfona, nifurtimox, amiodarona e alopurinol.

Fármacos	CC-50 (μ M) 72 horas				CC-50 (μ M) 120 horas			
	H9c2	H9c2i	HepG2	HepG2i	H9c2	H9c2i	HepG2	HepG2i
Fexi-sulfona	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Nifurtimox	360,2	314,2	>500	703,3	365,2	329,3	798,2	683,1
Amiodarona	15,1	21,4	26,1	41,2	17,7	15,1	22,8	25,7
Alopurinol	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Fonte: Autora.

Legenda: Células H9c2 e HepG2, infectadas ou não, foram incubadas com concentrações decrescentes dos fármacos por 72h e 120h. A viabilidade celular comparativamente ao controle foi investigada usando resazurina. Valores de CC-50 (concentração citotóxica para 50% das células hospedeiras) foram calculados no *software Compusyn*.

Figura 6 – Influência dos fármacos na viabilidade de células H9c2 e HepG2 na ausência e presença de infecção por *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Autora.

Legenda: Curvas de concentração-efeito construídas a partir do percentual de redução da resazurina das células na presença dos fármacos comparativamente às células controle – não infectadas e não tratadas. São apresentados os dados nos tempos de 72h e 120h e em ambos os tipos celulares, H9C2 e HepG2. # representa diferença estatística comparativamente ao controle não infectado, para o mesmo período ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram diferenças pontuais na viabilidade das células, a depender da combinação do tipo celular, fármaco e tempo de tratamento, e presença ou não da infecção por *T. cruzi*. Contudo, não foi possível identificar um padrão de diferença para quaisquer desses parâmetros. Considerando o efeito negativo na viabilidade das células exercido pela infecção isoladamente, seria plausível supor que concentrações tóxicas dos fármacos levariam a efeito cumulativo na toxicidade observada. No entanto, deve-se considerar que, pela natureza tripanossomicida dos fármacos, houve dramática redução da carga parasitária, confirmada pela observação microscópica das culturas (dados não mostrados). A atividade antiparasitária dessa forma funcionou como um fator protetivo à redução da viabilidade provocada pela infecção, de forma que o modelo de avaliação estabelecido não teve sucesso em avaliar concomitantemente se haveria efeito cumulativo de toxicidade dos fármacos (nas concentrações mais altas) mais o da infecção. De forma interessante, esse efeito foi perceptível para fexinidazol sulfona na concentração mais alta, o que pode indicar que, apesar de não haver efeito citotóxico, há alguma alteração em função da concomitância da infecção e fármaco, que leve gradualmente à redução da viabilidade.

Não foram encontrados na literatura dados que suportem ou refutem os achados obtidos. É curioso notar que fármacos em estágio tão avançado de uso ou avaliação clínica não apresentam dados claros relacionados à interação com as células hospedeiras do agente etiológico que se pretende eliminar. Pode-se inferir que por serem medicamentos de reposicionamento, como o fexinidazol-sulfona, alopurinol e amiodarona, ou utilizados há muitas décadas, como o nifurtimox, os estudos de citotoxicidade acabam por ser menos explorados. De fato, chama atenção que pouca pesquisa básica tem sido feita previamente aos últimos estudos clínicos para a doença de Chagas, o que resulta em lacunas no conhecimento dos mecanismos de ação e efeitos tóxicos (Rogers *et al.*, 2023). Apesar do caráter de reposicionamento, que poupa tempo e custos no desenvolvimento farmacológico, como se trata de uma possível nova aplicação, é salutar levar em consideração as peculiaridades do tratamento sobre a nova condição ou doença que se almeja tratar.

Devido à falta de protocolos padronizados, a utilização de diferentes condições experimentais e a grande variabilidade do parasito, bem como sua capacidade de infectar diversos tipos celulares, resulta em uma considerável variabilidade nos parâmetros utilizados para avaliar o efeito dos fármacos (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018). Em contrapartida, as recomendações mais recentes preconizam avaliações de

citotoxicidade apenas em células não infectadas para determinação do índice de seletividade dos fármacos (Dantas; Torres-Santos; Silva Jr, 2022). Da mesma forma, são escassos os dados de toxicidade *in vivo* em modelos experimentais infectados pelo parasito, o que tem resultado na ausência de conhecimento acerca dos efeitos a serem esperados no contexto do tratamento clínico dos pacientes (Rogers *et al.*, 2023).

Adicionalmente, quando se considera o tempo de tratamento dos pacientes com os fármacos de referência, benznidazol e nifurtimox, que é de 60 dias (Müller Kratz *et al.*, 2018b; Pérez-Molina *et al.*, 2021) e ainda, que os efeitos colaterais induzidos por esses fármacos são usualmente relatados pelos pacientes após o 10º dia de tratamento, acreditamos ser relevante o estudo por períodos maiores que 120 horas, de forma a simular o efeito cumulativo, particularmente nas células derivadas de fígado. Assim como os fármacos de referência, o fexinidazol deve ser administrado no mínimo 10 dias para alcançar efeito terapêutico (Torrico *et al.*, 2023) e a toxicidade clínica – incluindo a descontinuação do tratamento pelos pacientes, é dose e tempo-dependente (Watson *et al.*, 2019b). Considerando este contexto, foram realizados novos experimentos especificamente com o fexinidazol-sulfona, na expectativa compreender os mecanismos que levam à toxicidade clínica deste fármaco. Desta forma, foram exploradas maiores concentrações e período de tratamento com diferentes metodologias a seguir.

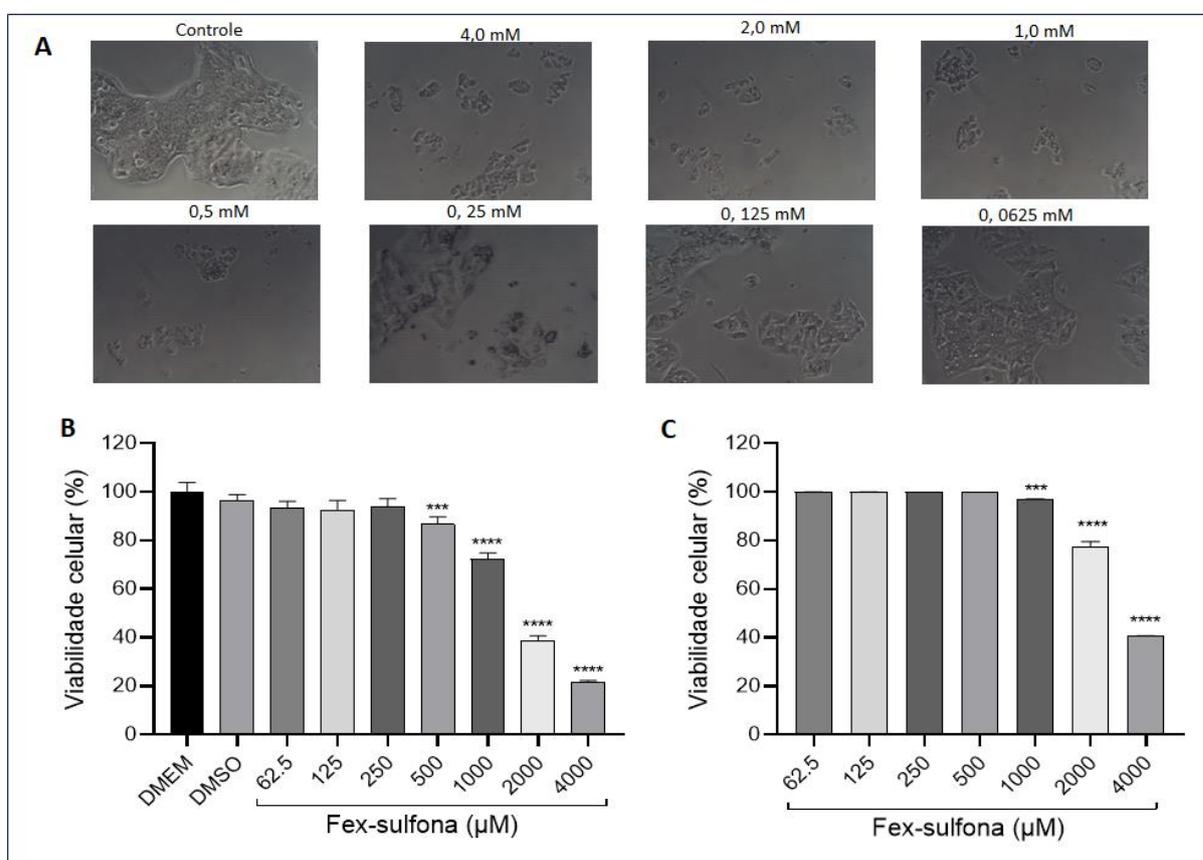
5.2 ENSAIO SULFORODAMINA B

Considerando os dados que indicaram discreta redução da viabilidade das células com a concentração de 1mM, a viabilidade das células HepG2 incubadas com concentrações superiores de fexinidazol-sulfona foi investigada, sendo incluído um novo método, o ensaio usando Sulforodamina B. Foram também realizadas a foto documentação das culturas, a fim de realizar observações sobre a saúde das células.

A Figura 7 mostra a viabilidade das células HepG2 tratadas com fexi-sulfona por 72 horas. Neste experimento, foi também incluído um ensaio empregando resazurina, a fim de comparar os resultados obtidos com os diferentes métodos. De fato, a observação das imagens 7A e 7B mostra que o ensaio de Sulforodamina B identificou redução significativa da viabilidade a partir da concentração de 500µM, enquanto por meio da resazurina essa redução ocorreu apenas com 1000 µM. Adicionalmente, aos percentuais de viabilidade foram sempre inferiores para o método da

Sulforodamina B. De toda forma, ambos os métodos mostraram efeito citotóxico evidente - isto é, redução de mais de 30% na viabilidade celular, nas concentrações de 2mM e 4 mM (Figura 7B e 7C). Esse efeito é mostrado também nas fotomicrografias mostradas em 6A, onde são observadas células rarefeitas nas maiores concentrações. Curiosamente, mesmo as concentrações mais baixas, de 0,25 e 0,125mM, induziram alterações na morfologia das células, apesar de não resultarem em alteração numérica na viabilidade das células.

Figura 7 – Viabilidade de células HepG2 tratadas com fexinidazol-sulfona por 72 horas.



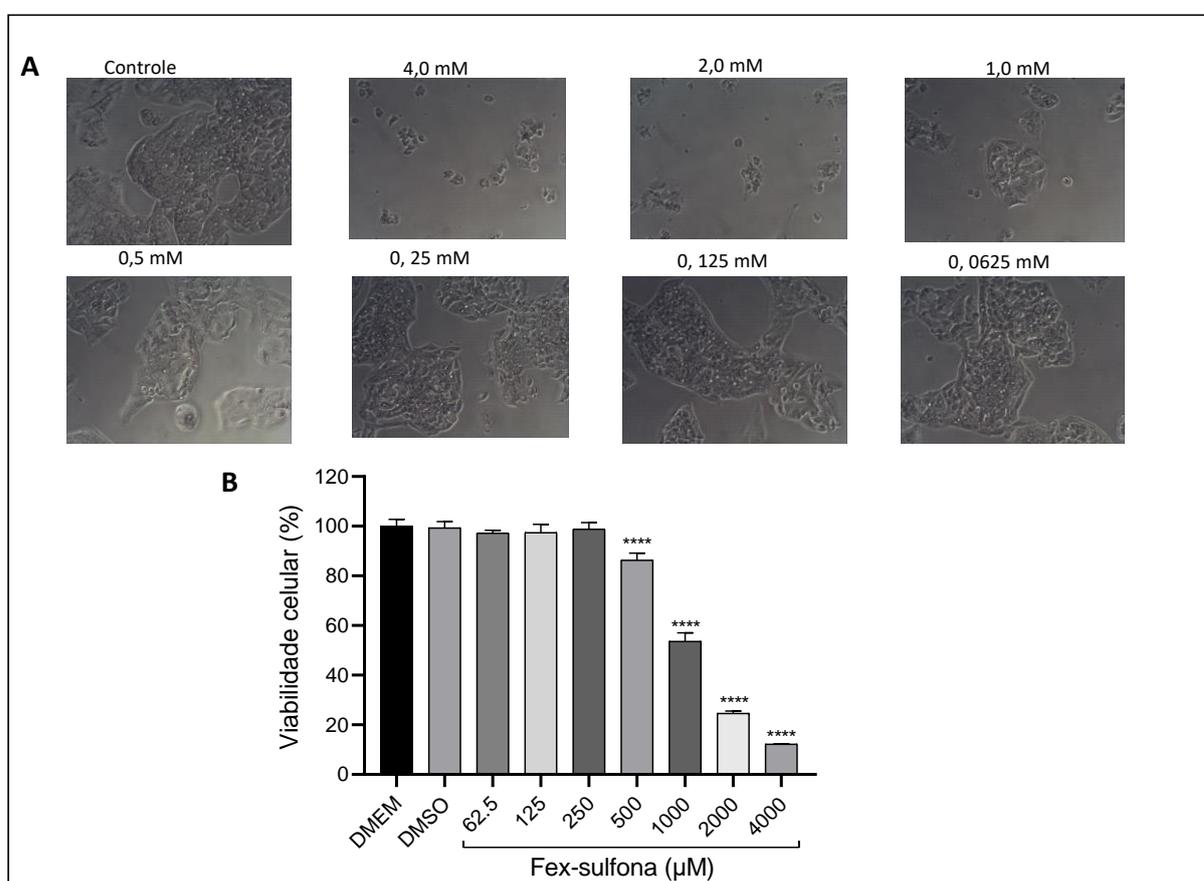
Fonte: Autora.

Legenda: Células HepG2 foram incubadas por 72 horas com o fármaco fexinidazol-sulfona. Em A é apresentado imagens representativas dos poços com células e fármaco. Em B a porcentagem da viabilidade celular identificada pelo método da Sulforodamina B. Em C a porcentagem da viabilidade celular identificada pelo método da resazurina. O * representa diferença estatística ($p < 0,05$).

A fim de averiguar qual seria o comportamento das células resultante do aumento do tempo de exposição com concentrações maiores do fármaco, foi determinada a viabilidade das células por Sulforodamina B com 120h de exposição. De forma

interessante, a Figura 8 mostra que quando as células HepG2 foram mantidas por período prolongado na presença de fexinidazol-sulfona, houve uma redução acentuada da viabilidade celular (Figura 8B), mas apenas nas concentrações que interferiram na viabilidade no ensaio com 72 horas. Houve redução significativa do número de células a partir da concentração de 500uM, que pode ser observada também nas imagens representativas da microscopia de contraste de fases (Figura 8).

Figura 8 – Viabilidade de células HepG2 tratadas com fexinidazol-sulfona por 120 horas.

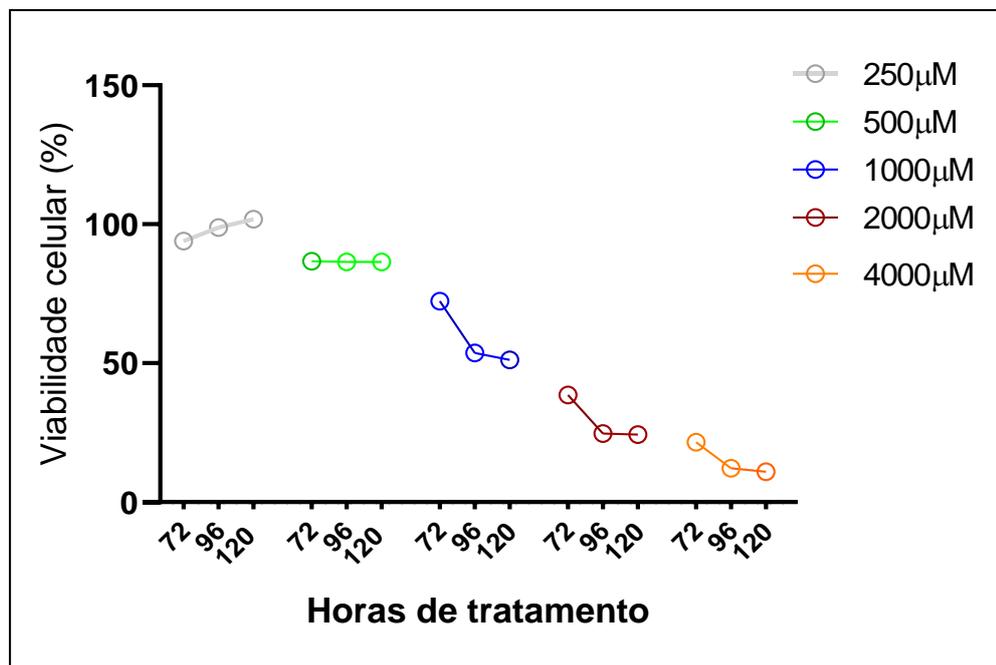


Fonte: Autora.

Legenda: Células HepG2 foram incubadas por 120 horas com o fármaco fexinidazol-sulfona. O percentual de viabilidade celular comparativamente ao controle foi estabelecido por meio de Sulforodamina B. Em A é apresentado imagens representativas dos poços com células e fármaco. Em B a porcentagem da viabilidade celular. O * representa diferença estatística ($p < 0,05$).

A Figura 9 mostra a viabilidade das células ao longo das faixas de concentração e tempo utilizadas. Os dados foram extraídos do experimento de Sulforodamina apresentados anteriormente.

Figura 9 – Cinética da viabilidade de células HepG2 incubadas com fexinidazol-sulfona.



Fonte: Autora.

Legenda: Células HepG2 tratadas com o fármaco fexinidazol-sulfona em diferentes concentrações por 72h, 96h e 120h a partir do ensaio de Sulforamina B.

É perceptível a resposta concentração-dependente, sendo o período de 96 horas o que possibilitou detectar o delta máximo de viabilidade para as concentrações tóxicas, de 1000 a 4000 µM no modelo experimental utilizado (Figura 9).

Esses resultados conflitam com aqueles obtidos com o ensaio de resazurina, visto que não havia sido observado efeito citotóxico para concentrações abaixo de 1mM e, ainda, nessa concentração, a inibição da viabilidade foi de menos de 10%, enquanto no ensaio de Sulforodamina foi maior que 40%. Essa discrepância pode estar relacionada com os diferentes princípios dos métodos; enquanto a resazurina emprega uma reação bioquímica que envolve enzimas mitocondriais e indica atividade metabólica das células presentes (Lavogina *et al.*, 2022), o ensaio de Sulforodamina B estima o total de células por meio da quantificação do teor de proteínas (Vichai; Kirtikara, 2006). Desta forma permite estimar a viabilidade por meio da comparação com o número de células controle. Uma das limitações da resazurina, por envolver metabolismo mitocondrial, é levar a vieses na aferição da viabilidade celular quando há fármacos que estimulam ou inibem a atividade mitocondrial. Esses dados apontam para a importância de se explorar métodos distintos na avaliação mais criteriosa de

candidatos a fármacos e nos mostraram que, para além da viabilidade das células, seria importante acompanhar a proliferação das células ao longo do tempo.

Neste contexto, foi realizado um experimento para acompanhar o crescimento da população das células HepG2, na ausência e presença de tratamento, por um período estendido.

5.3 CRESCIMENTO POPULACIONAL A LONGO PRAZO

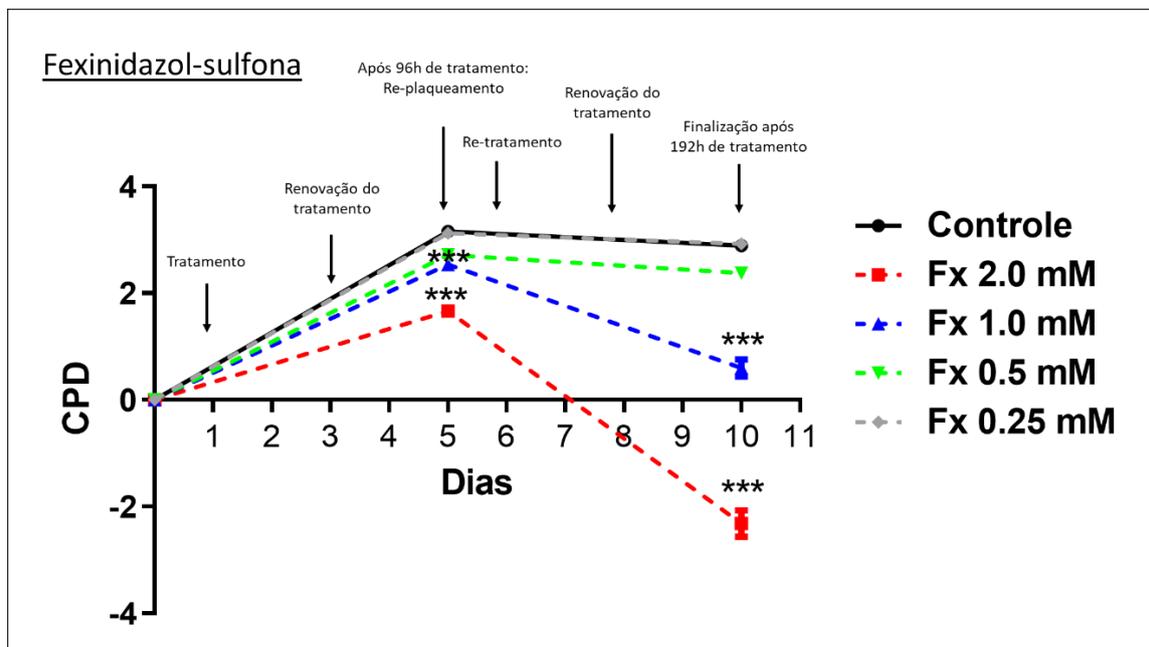
Embora a doença de Chagas seja uma doença crônica, a maioria dos experimentos *in vitro* para acessar a atividade de uma dada intervenção são realizados no período de horas ou dias. Evidências têm sido acumuladas mais recentemente sobre a importância da utilização de protocolos *in vitro* de tratamento estendido – com *washout*, para aumentar a compreensão sobre o sucesso ou falha na atividade tripanossomicida, particularmente sobre as formas intracelulares. No entanto, com relação às avaliações do potencial citotóxico, as análises se limitam, quando muito, à determinação da CC-50, com períodos de incubação que habitualmente vão no máximo até 72 horas (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018). Neste sentido, é importante explorar metodologias que permitam avaliar, de forma longitudinal, as alterações em longo prazo das células submetidas a um determinado tratamento (Madorran *et al.*, 2020).

Para compreender as alterações na população de células resultantes da incubação com fexinidazol-sulfona, foi adaptado um protocolo que nos permitiu acompanhar a cultura durante 8 dias de tratamento. A Figura 9 mostra os valores de duplicação cumulativa da população (*CPD – cumulative population doubling*) para uma faixa de concentrações do fármaco tóxicas ou não. Nas primeiras 96 horas de tratamento, a capacidade proliferativa das células tratadas com fexi-sulfona foi mantida, apesar do CPD ser menor do que o controle na presença das concentrações de 2mM e 1mM (Figura 10).

De forma interessante, com a manutenção da pressão do fármaco, as células tratadas com as duas maiores concentrações de fexinidazol-sulfona apresentaram redução significativa da atividade proliferativa a partir de 96 horas de tratamento, período não observado nos experimentos anteriores. Esses resultados são importantes por sugerirem que o perfil de toxicidade observado para fexinidazol sulfona pode estar relacionado não a uma toxicidade direta sobre as células

hospedeiras, mas a uma limitação na capacidade proliferativa a depender do tempo de exposição.

Figura 10 – Análise da proliferação de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de fexi-sulfona por tempo prolongado.



Fonte: Autora.

Legenda: Células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de fármaco fexi-sulfona utilizando-se a técnica de crescimento populacional a longo prazo (CPD). Em preto controle de células apenas, em vermelho células com 2mM de fármaco, azul 1mM, verde 0,5mM e cinza 0,25mM. * representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os resultados dos estudos clínicos realizados com o fexinidazol mostram claramente que os efeitos adversos do tratamento são iniciados de 8 a 10 dias após a administração da primeira dose do fármaco. Considerando esse recorte de tempo, acreditamos que o modelo de avaliação de longo prazo desenvolvido em nosso trabalho pode ser útil para mapear as alterações celulares que serão mais correlacionadas com os efeitos *in vivo* comparado aos experimentos de curto prazo.

Seria de grande interesse, para o mapeamento dessas alterações, conhecer melhor o mecanismo de ação do fexinidazol. Enquanto fármaco nitroaromático, o fexinidazol necessita ser bioativado por nitroreductase tipo I específica do parasito para exercer seu efeito tripanossomicida. A consequência dessa bioativação é variável e pode levar à formação de moléculas altamente reativas que levam a danos no DNA. Ainda não há definições claras sobre o mecanismo de ação do fexinidazol, mas a literatura mais recente tem mostrado que essa molécula resulta em pronunciada

interferência na síntese de DNA do parasito (Rogers *et al.*, 2023). Permanecem por ser definidos os mecanismos de toxicidade para os hospedeiros, contudo, nosso estudo amplia a base de dados acerca dos efeitos do fexinidazol-sulfona e outros fármacos tripanossomicidas sobre as células de mamíferos e, juntamente ao modelo proposto para avaliação em longo prazo das culturas - inédito em quimioterapia de Chagas de acordo com nosso conhecimento, poderá auxiliar no estabelecimento de modelos de avaliação pré-clínica de maior valor translacional.

6 CONCLUSÃO

- O tipo celular hospedeiro impacta no perfil de toxicidade, não como fator isolado relacionado exclusivamente à célula, mas a depender do mecanismo de ação do fármaco e fisiologia da célula hospedeira;

- A infecção por *T. cruzi*, nas condições experimentais avaliadas, não foi determinante para o aumento da toxicidade dos fármacos tripanossomicidas avaliados;

- O perfil de toxicidade dos fármacos tripanossomicidas avaliado por meio do ensaio de resazurina foi concentração-dependente, mas não tempo-dependente;

- Fexinidazol-sulfona apresenta potencial citotóxico dependente da concentração e do tempo;

- A exposição prolongada de células HepG2 ao fexinidazol-sulfona leva a limitação da capacidade proliferativa das células após 8 dias de tratamento;

- O modelo de exposição prolongada utilizado no trabalho será útil para compreender, com maior valor translacional, as alterações induzidas pelos fármacos ao longo do curso de tratamento *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADESSE, D. *et al.* Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 203–210, Jan. 2011.
- ALGHARABLY, E. A. EL-H. *et al.* Prediction of the dose range for adverse neurological effects of amiodarone in patients from an *in vitro* toxicity test by *in vitro–in vivo* extrapolation. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1433–1442, 19 Apr. 2021.
- ALONSO-PADILLA, J. *et al.* Automated high-content assay for compounds selectively toxic to *Trypanosoma cruzi* in a myoblastic cell line. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e0003493, 23 Jan. 2015.
- ANDRADE, S. G. *et al.* Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 397–407, 15 Jan. 1985.
- AVILA, J.; AVILA, A. *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. **Experimental Parasitology**, v. 51, n. 2, p. 204–208, 1981.
- BAHIA, M. T. *et al.* Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1870, 1 Nov. 2012.
- BAHIA, M. T. *et al.* Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4362–4370, Aug. 2014.
- BARBOSA, J. M. C. *et al.* Benznidazole and amiodarone combined treatment attenuates cytoskeletal damage in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 975931, 25 Aug. 2022.
- BENAIM, G.; PANIZ-MONDOLFI, A. E.; SORDILLO, E. M. The rationale for use of amiodarone and its derivatives for the treatment of Chagas' disease and Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 15, p. 1825–1833, Apr. 2021.
- BENAIM, G.; PANIZ MONDOLFI, A. E. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 605–609, 7 Oct. 2012.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 July 2015.
- BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and pathogenesis of Chagas heart disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421–447, 24 Jan. 2019.

BOSCARDIN, S. B. *et al.* Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6b, p. 1373–1384, 26 June 2010.

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

CHATELAIN, E.; SCANDALE, I. Animal models of Chagas disease and their translational value to drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 12, p. 1381–1402, 1 Dec. 2020.

CHIOVATO, L. *et al.* Studies on the *in vitro* cytotoxic effect of amiodarone. **Endocrinology**, v. 134, n. 5, p. 2277–2282, 1994.

CORSINI, A. *et al.* Current challenges and controversies in drug-induced liver injury. **Drug Safety**, v. 35, n. 12, p. 1099–1117, 2012.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

DAMASIO, D. S. DO N. *et al.* A new oral self-emulsifying drug delivery system improves the antileishmania efficacy of fexinidazole *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 631, p. 122505, 25 Jan. 2023.

DANTAS, R. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; SILVA JR, F. P. Past and future of trypanosomatids high-throughput phenotypic screening. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

DE ABREU COSTA, L. *et al.* Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1789, 10 Nov. 2017.

DE FREITAS OLIVEIRA, J. W. *et al.* Insights of antiparasitic activity of sodium diethyldithiocarbamate against different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11200, 27 maio 2021.

DE FREITAS OLIVEIRA, J. W. *et al.* *In vitro* validation of antiparasitic activity of PLA-nanoparticles of sodium diethyldithiocarbamate against *Trypanosoma cruzi*. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, 1 Mar. 2022.

DE MORAIS-TEIXEIRA, E.; RABELLO, A.; AGUIAR, M. M. G. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of fexinidazole against New World Leishmania species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 8, p. 2318–2325, 1 Aug. 2019.

DE RYCKER, M. *et al.* Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498–506, 25 July 2018.

DEEKS, E. D. Fexinidazole: first global approval. **Drugs**, v. 79, n. 2, p. 215–220, Feb. 2019.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, June 2016.

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 and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, June 2018.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, n. 1, p. 1–27, 1990.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 287, June 2008.

ESPÍNDOLA, M. R. *et al.* *In vitro* assessment for cytotoxicity screening of new antimalarial candidates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, 2022.

FENTON, A. R.; JONGENS, T. A.; HOLZBAUR, E. L. F. Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 68, p. 28–36, 1 Feb. 2021.

FERREIRA, E. R. *et al.* Parasite-mediated remodeling of the host microfilament cytoskeleton enables rapid egress of *Trypanosoma cruzi* following membrane rupture. **mBio**, v. 12, n. 3, 29 June 2021.

FERREIRA, I. D. L. M.; SILVA, T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507–509, 1 Oct. 2006.

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**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1 Sept. 1987.

FONSECA-BERZAL, C. *et al.* Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3367–3380, 2018.

GOBBI, P. *et al.* Allopurinol is effective to modify the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1459–1462, 10 July 2007.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 1 May 2012.

IMRAN, M. *et al.* Discovery, development, inventions and patent review of fexinidazole: the first all-oral therapy for Human African Trypanosomiasis. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 128, 21 Jan. 2022.

KAMALIAN, L. *et al.* The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 4, p. 732–740, 2015.

KIMES, B. W.; BRANDT, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Experimental Cell Research**, v. 98, n. 2, p. 367–381, 1976.

KRATZ, J. M. *et al.* The translational challenge in Chagas disease drug development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, n. 1, p. e200501, 23 May 2022.

LAVOGINA, D. *et al.* Revisiting the resazurin - based sensing of cellular viability: widening the application horizon. **Biosensors**, v. 12, n. 4, p. 196, 1 Apr. 2022.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, n. 6, p. 1–13, 2 July 2019.

LÓPEZ-TERRADA, D. *et al.* HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. **Human Pathology**, v. 40, n. 10, p. 1512–1515, 1 Oct. 2009.

LÓPEZ-GARCÍA, A.; GILABERT, J. A. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, 24 July 2023.

MACLEAN, L. M. *et al.* Development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro* assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006612, 12 July 2018.

MADORRAN, E. *et al.* *In vitro* toxicity model: Upgrades to bridge the gap between preclinical and clinical research. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 2, p. 157, 30 Apr. 2020.

MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. J. Antitrypanosomal effect of allopurinol: Conversion *in vivo* to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma cruzi*. **Science**, v. 201, n. 4360, p. 1018–1020, 1978.

MARTÍN-ESCOLANO, J. *et al.* An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: intervention points for an effective treatment. **ACS infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 June 2022.

MAZZETI, A. L. *et al.* Synergic effect of allopurinol in combination with nitroheterocyclic compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, 2019.

MAZZETI, A. L. *et al.* Review on experimental treatment strategies against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of experimental pharmacology**, v. 13, p. 409–432, 2021a.

MAZZETI, A. L. *et al.* Combination therapy using nitro compounds improves the efficacy of experimental Chagas disease treatment. **Parasitology**, v. 148, n. 11, p. 1320–1327, 18 Sept. 2021b.

- MIRANDA, C. G. *et al.* A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 152, p. 8–16, Dec. 2015.
- MORAES, K. C.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 181–191, 2015.
- MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 28 Feb. 2017.
- MOSKOT, M. *et al.* The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in gene expression modulation and glycosaminoglycan metabolism in lysosomal storage disorders on an example of mucopolysaccharidosis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, 2 Jan. 2019.
- MÜLLER KRATZ, J. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018a.
- MÜLLER KRATZ, J. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 3 Oct. 2018b.
- NACCA, N. *et al.* Severe amiodarone induced pulmonary toxicity. **Journal of Thoracic Disease**, v. 4, n. 6, p. 667–670, 2012.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, June 2014.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. *et al.* Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 39, n. 9, p. 458–470, Nov. 2021.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.
- 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**, v. 0, n. 0, 2024.
- RAVIOLO, M. A. *et al.* Synthesis, physicochemical properties of allopurinol derivatives and their biological activity against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 455–464, 2013.
- ROGERS, I. *et al.* Fexinidazole induced cytotoxicity is distinct from related anti-trypanosome nitroaromatic drugs. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 9 Oct. 2023.

- ROLÓN, M. *et al.* Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103–107, 28 July 2006.
- ROMANHA, A. J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.
- ROZMAN, K. K.; DOULL, J. Dose and time as variables of toxicity. **Toxicology**, v. 144, n. 1–3, p. 169–178, 2000.
- SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. 1–20, 2018.
- SCHOONEN, W. G. E. J. *et al.* Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II Mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 4, p. 491–503, 2005.
- SILVA, A. O. *et al.* A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 13743–13749, 2016.
- SINGH, B. N. Amiodarone: Historical development and pharmacologic profile. **American Heart Journal**, v. 106, n. 4 II, p. 788–797, 1983.
- SIRENKO, O. *et al.* High-content assays for hepatotoxicity using induced pluripotent stem cell-derived cells. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 1, p. 43–54, 2014.
- SOSA, R. R.; GALLERANO, R. H.; MARR, J. J. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 2, p. 159–166, 1 Aug. 1990.
- STEIN, C. *et al.* Amiodarone for arrhythmia in patients with Chagas disease: A systematic review and individual patient data meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, 2018.
- TERZO, F. *et al.* Amiodarone-induced pulmonary toxicity with an excellent response to treatment: A case report. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 29, p. 100974, 2020.
- TORREELE, E. *et al.* Fexinidazole - a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–15, 2010.
- TORRICO, F. *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease: proof-of-concept randomized placebo-controlled study of benznidazole and three E1224 dosing regimens. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 419, 4 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. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1129–1140, 1 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. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 3, p. e1186–e1194, 8 Feb. 2023.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- WATSON, J. A. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of the hepatic and bone marrow toxicities of the new trypanoside fexinidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 4, Apr. 2019a.
- WATSON, J. A. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of the hepatic and bone marrow toxicities of the new trypanoside fexinidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 1–16, Apr. 2019b.
- WITEK, P. *et al.* The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2407–2415, 1 Dec. 2016.
- WYLLIE, S. *et al.* The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral Leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 119, 1 Feb. 2012.
- ZAHNO, A. *et al.* The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 432–441, 2011.
- ZUMA, A. A.; DE SOUZA, W. Fexinidazole interferes with the growth and structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.