



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



DAVID FERNANDES DE SOUZA

Efeito do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II

Maringá

2019

DAVID FERNANDES DE SOUZA

Efeito do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II

Dissertação apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S237e Souza, David Fernandes de
Efeito do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II / David Fernandes de Souza. -- Maringá, 2019.
58 f.

Orientador: Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019.

1. *Trypanosoma cruzi* I e II. 2. Camundongos - Infecção oral - *Trypanosoma cruzi* I e II. 3. Doença de Chagas - Tratamento - Benzonidazol. I. Toledo, Max Jean de Ornelas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 23.ed. 616.9363

Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

DAVID FERNANDES DE SOUZA

Efeito do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II

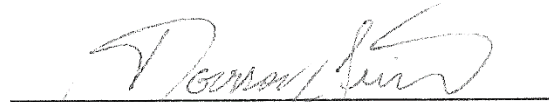
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração- Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 22/08/2019

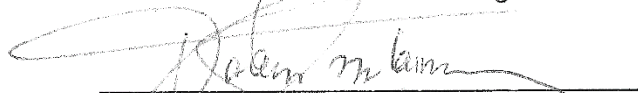
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador)
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Gerson Zanusso Junior (Membro externo)
Centro Universitário Ingá



Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura (Membro interno)
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

David Fernandes de Souza é natural Januária, cidade do sertão norte mineiro, onde morou até os 18 anos, concluindo ali sua educação básica. Mudou-se para Itatiba, no interior de São Paulo, onde graduou-se em Farmácia na Universidade São Francisco (USF) e posteriormente em Biologia no Centro Universitário Claretiano (CEUCLAR). Atualmente reside em Umuarama, a capital da amizade, no interior do Paraná, onde atua como professor no Instituto Federal do Paraná.

Dedico este trabalho à toda a minha família, em especial meus pais, seu Nelson e dona Luiza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro à Deus, que com sua bondade me permitiu nascer no seio da melhor família, dos melhores pais, dos melhores irmãos. Seu Nelson e dona Luiza, meus pais, vocês que com tanto amor e carinho cuidaram de mim e tentaram sempre fazer o melhor, muito obrigado, amo vocês! Aos meus irmãos, que sempre me apoiaram e me incentivaram, sempre ao meu lado, muito obrigado, amo vocês também. Muito obrigado também aos meus cunhados e sobrinhos que sempre me apoiaram.

Agradeço às professoras Dra Sônia Gurgueira e Dra Michelle Darrieux que me permitiram trilhar os primeiros passos da vida científica, obrigado por confiarem em mim. O mesmo agradecimento estende-se à Universidade São Francisco, onde me graduei. Tenho enorme admiração e apreço por esta instituição que me acolheu. Acredito e perpetuo o seu lema, “Educação para a paz”.

À Elisangela Ângelo, mais que minha colega de trabalho, minha amiga. Obrigado por me incentivar a me inscrever no mestrado e por ouvir muito tempo de lamentações... seu apoio foi fundamental, muito obrigado.

Agradeço ao meu orientador, professor Max Jean de Ornelas Toledo, por ter aceito ser o meu orientador. Orientar um aluno que mora longe e trabalha é um verdadeiro desafio. Muito obrigado por sua disposição e empenho. Obrigado por “comprar essa briga” professor, ela me conduzirá não somente ao título de mestre, mas também ao primeiro mestre da minha família, o primeiro descendente mestre de alguém que um dia foi escravizado.

Agradeço imensamente ao Ricardo Drozino, colega de laboratório e amigo pessoal, muito obrigado por todo apoio e a parceria de sempre. Vai uma cokinha aí fiote?!

Marcella Sarto, parceira de laboratório, muito obrigado por todo apoio, socorros e generosidade. Meus sinceros agradecimentos a todos os colegas do laboratório, Hevillyn, Ana Abreu, Nilma, Giulia, João, obrigado pela excelente convivência.

Agradeço também aos técnicos Eli, Sandra, Betânia, Isabel, Silvana... a ajuda de vocês foi fundamental para a concretização deste trabalho. Muito obrigado por toda ajuda e conselhos.

Agradeço, de coração a todos os meus amigos que sempre tiveram uma palavra de apoio, de incentivo e a excelente companhia: Danilo, Carina, Elisangela, Amanda, Rafael, Adolfo, Filipe e Katia. Muito obrigado!

APRESENTAÇÃO DO CONTEÚDO DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho apresenta resumo e palavras-chaves, lista de abreviaturas e siglas, sumário, um artigo científico, além de dois anexos, sendo o primeiro composto por figuras e tabelas do artigo e o segundo pelas normas da revista.

O artigo apresentado no presente tem como título: “**Efeito do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II**” e se encontra formatado de acordo com as normas da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical disponível em: <
<http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/pinstruc.htm>>

RESUMO

Introdução: A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e acomete oito milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente no Brasil, a forma mais frequente de transmissão do parasito é a via oral, correspondendo à cerca de 70% dos novos casos. A DC oral tem se mostrado mais severa e difícil de se tratar do que a infecção adquirida pela via vetorial clássica. Como ainda não há drogas totalmente eficazes e seguras para a DC, novos esquemas terapêuticos têm sido testados, como o prolongamento do tempo de tratamento com o benzonidazol (BZ), única droga disponível no mercado brasileiro.

Métodos: Camundongos *Swiss* foram inoculados por via oral (VO) com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos das cepas colombiana (TcI) e Y (TcII) e tratados por VO durante 20, 40 e 60 dias consecutivos com 100 mg / kg / dia de BZ. Amostras de sangue foram coletadas para a obtenção dos parâmetros parasitológicos derivados da curva de parasitemia, realização de hemocultura (HC) e PCR em tempo real (qPCR). Após o tratamento, os animais foram imunossuprimidos com 50 mg / kg / dia de ciclofosfamida e novas amostras de sangue e tecido cardíaco coletadas para a qPCR. Animais que apresentaram pelo menos um dos exames positivos foram considerados não curados.

Resultados: Camundongos inoculados por VO com a cepa TcI apresentaram menores valores de parasitemia, positividade da HC e mortalidade (20% TcI; 50-% TcII) do que os inoculados com a cepa TcII, sugerindo maior severidade desta última na infecção oral. A qPCR apresentou-se positiva em todos animais, tanto nos controles não tratados quanto nos tratados com BZ por diferentes tempos de tratamento.

Conclusão: Embora o tratamento com BZ tenha reduzido os parâmetros parasitológicos e aumentando a sobrevida dos animais inoculados por VO com as duas cepas TcI e TcII estudadas, as características biológicas das cepas do parasito assim como a

biodisponibilidade e toxicidade hepática do BZ podem ter limitado a sua eficácia. A mudança no regime de tratamento com BZ, prolongando o tempo de administração do fármaco de 20 para 60 dias, não alterou sua eficácia na infecção oral murina experimental pelas cepas TcI e TcII estudadas.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi* I e II, infecção oral, camundongos, regime de tratamento, benzonidazol.

ABSTRACT

Introduction: Chagas disease (CD) or American trypanosomiasis is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects eight million people worldwide. Currently, in Brazil, the most frequent form of parasite transmission is by oral route, corresponding to about 70% of new cases. Oral CD has been more severe and difficult to treat than classic vector-acquired infection. As there are still no fully effective and safe drugs for CD, new therapeutic regimens have been tested, such as prolonging treatment time with benznidazole (BZ), the only drug available in the Brazilian market.

Methodology: Groups of Swiss mice (n = 10) were orally inoculated (OI) with 1×10^4 blood trypomastigotes of Colombian (TcI) and Y (TcII) strains and treated by oral route for 20, 40 and 60 consecutive days with 100 mg / kg / day of BZ. Both treated animals (TBZ) and untreated controls (NT) were submitted to fresh blood examination to obtain parasitological parameters derived from the parasitemia curve, blood culture (BC) and real time PCR (qPCR). Following BZ treatment, the animals were immunosuppressed with cyclophosphamide 50 mg / kg / day and evaluated by qPCR in blood and cardiac tissue. Animals that presented at least one positive test were considered therapeutic failure.

Results: Mice orally inoculated with the TcI strain presented lower levels of parasitemia, BC positivity and mortality rates than those inoculated with the TcII strain, suggesting higher severity of the latter in oral infection. The different treatment times promoted significant reduction in all evaluated parameters and for both strains, except in the qPCR that was positive in all animals (100% positivity), both in TBZ animals, for different times, and in NT controls.

Conclusion: Treatments with BZ for different times promoted significant reduction in parameters derived from the parasitemia curve and BC positivity and increased survival of animals. However, the change in the BZ treatment regimen, extending the drug administration time from 20 to 60 days, did not alter its efficacy in experimental murine oral infection by the studied TcI and TcII strains.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMA – Amastigota

ASC – Área sob a curva

BZ – Benzonidazol

CEUA – Comissão Ética no Uso de Animais

CNT – Controle não-tratado

CP – Carga parasitária

Cy – Ciclofosfamida

Dai – Dia após inoculação

DC – doença de Chagas

DPmax – dia do pico máximo

DTU – Unidade de Tipagem Distinta

ESF – Exame de sangue a fresco

ERN – Espécie reativa de nitrogênio

EROS – Espécies reativas de oxigênio

HC – Hemocultura

IP – Intraperitoneal

LIT – Liver Infusion and Tryptose

NX – Nifurtimox

Pmax – Pico máximo

PP – Período patente

PPP – Período pré-patente

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

%qPCR+ - Porcentagem de animais com qPCR positiva

TBZ – Tratado com benzonidazol

TcI – *Trypanosoma cruzi* I

TcII – *Trypanosoma cruzi* II

TS – Tripomastigota sanguíneo

VO – Via oral

%INF – Taxa de infecciosidade

%MORT -Taxa de mortalidade

SUMÁRIO

TÍTULO.....	14
RESUMO.....	15
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO.....	30
CONFLITOS DE INTERESSE.....	31
SUPORTE FINANCEIRO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO I.....	37
ANEXO II.....	42

Efeito do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II

O aumento no tempo de tratamento não altera a eficácia do benzonidazol em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* I e II

David Fernandes de Souza^[1,3], Ricardo Nascimento Drozino^[1], Marcella Paula Mansano Sarto^[2], Nilma de Souza Fernandes ^[1], Max Jean de Ornelas Toledo^{[1,2]*}

^[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná (PR), Brasil;

^[2] Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UEM, Maringá, PR, Brasil;

^[3] Instituto Federal do Paraná, Umuarama, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência: Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo 5790, Bloco I-90, Zona 7, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil. Fax: +55 21 44 3011 4860.

RESUMO

Introdução: A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e acomete oito milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente no Brasil, a forma mais frequente de transmissão do parasito é a via oral, correspondendo à cerca de 70% dos novos casos. A DC oral tem se mostrado mais severa e difícil de se tratar do que a infecção adquirida pela via vetorial clássica. Como ainda não há drogas totalmente eficazes e seguras para a DC, novos esquemas terapêuticos têm sido testados, como o prolongamento do tempo de tratamento com o benzonidazol (BZ), única droga disponível no mercado brasileiro.

Métodos: Camundongos *Swiss* foram inoculados por via oral (VO) com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos das cepas colombiana (TcI) e Y (TcII) e tratados por VO durante 20, 40 e 60 dias consecutivos com 100 mg / kg / dia de BZ. Amostras de sangue foram coletadas para a obtenção dos parâmetros parasitológicos derivados da curva de parasitemia, realização de hemocultura (HC) e PCR em tempo real (qPCR). Após o tratamento, os animais foram imunossuprimidos com 50 mg / kg / dia de ciclofosfamida e novas amostras de sangue e tecido cardíaco coletadas para a qPCR. Animais que apresentaram pelo menos um dos exames positivos foram considerados não curados.

Resultados: Camundongos inoculados por VO com a cepa TcI apresentaram menores valores de parasitemia, positividade da HC e mortalidade (20% TcI; 50-% TcII) do que os inoculados com a cepa TcII, sugerindo maior severidade desta última na infecção oral. A qPCR apresentou-se positiva em todos animais, tanto nos controles não tratados quanto nos tratados com BZ por diferentes tempos de tratamento.

Conclusão: Embora o tratamento com BZ tenha reduzido os parâmetros parasitológicos e aumentando a sobrevivência dos animais inoculados por VO com as duas cepas TcI e TcII estudadas, as características biológicas das cepas do parasito assim como a biodisponibilidade e toxicidade hepática do BZ podem ter limitado a sua eficácia. A

mudança no regime de tratamento com BZ, prolongando o tempo de administração do fármaco de 20 para 60 dias, não alterou sua eficácia na infecção oral murina experimental pelas cepas TcI e TcII estudadas.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi* I e II, infecção oral, camundongos, regime de tratamento, benzonidazol.

INTRODUÇÃO

Estima-se que oito milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectados com o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, infecção que causa de mais 10 mil mortes por ano, sendo um sério problema de saúde pública, principalmente na América Latina [1,2]

T. cruzi é um protozoário hemoflagelado de vida intracelular e apresenta notável heterogeneidade genética, com a espécie dividida em seis linhagens genéticas ou unidades de tipagem distintas (DTU), designadas de TcI à TcVI [3]. As cepas de diferentes DTU podem apresentar propriedades biológicas distintas, incluindo resistência a fármaco [4,5]. A principal forma de aquisição da DC é por meio da transmissão vetorial, ou seja, o contato com as excretas de triatomíneos, dos quais três gêneros apresentam importância epidemiológica: *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma* [6]. Após a penetração do parasito no hospedeiro tem início a fase aguda da DC, caracterizada pela presença das formas tripomastigotas no sangue (TS), que infectam diversos órgãos, provocando lesões e destruição celular [7-9]. Após a 8ª semana de infecção, dá-se início à fase crônica, que é caracterizada pela presença das formas amastigotas (AMA) em diferentes tecidos do hospedeiro e ausência das formas TS circulantes [10]. Esta fase geralmente é assintomática (em 50 a 70% dos casos), podendo apresentar sintomas relacionados à presença dos parasitos nos tecidos (músculo cardíaco e liso, e nervoso) causando morte celular, fibrose tecidual e infiltrado inflamatório [7,8]

Entre 1962 e 1970, dois fármacos foram disponibilizados no mercado mundial: o nifurtimox (NX) e o benzonidazol (BZ) [11,12]. O NX é um 5-nitrofurano produzido pela Bayer e comercialmente chamado Lampit®, com o uso descontinuado no Brasil desde a década de 1980. O BZ atua na formação de radicais livres pela redução do grupo nitro produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERN) durante o

metabolismo (principalmente OH^{*} e óxido nítrico [NO]), que também, por meio de injúrias celulares, mata as formas TS e AMA do parasito [13-15]. Uma série de efeitos colaterais decorrentes do uso deste fármaco tem sido descrito, como hepatite tóxica, imunossupressão, intolerância digestiva e anorexia [16-18].

Por outro lado, a via de transmissão oral (VO) seja, provavelmente, a mais antiga estratégia para a dispersão de *T. cruzi* entre mamíferos e tem se destacado no cenário epidemiológico atual na transmissão da DC. Vem sendo demonstrado pelo nosso grupo que a infecção experimental de camundongos pela via oral com diferentes cepas de *T. cruzi* (TcI, TcII e TcIV) pode ser mais severa em relação à via intraperitoneal [19-20].

Enquanto uma droga tripanocida com maior eficácia não é apresentada, novos esquemas terapêuticos usando as disponíveis no mercado devem ser testados, visando aumento na eficácia, qualidade de vida dos pacientes e cura [21]. Acredita-se que com a extensão do tempo de tratamento com o BZ, o fármaco atue nos parasitos de replicação lenta, como demonstrado por MAZZETTI et al. (2018) [22] que, em estudos não clínicos, obtiveram evidências de que a eficácia do BZ é dose e tempo dependente, fornecendo dados relevantes para otimizar o tratamento de pacientes com DC.

Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito do tempo de tratamento na eficácia do BZ em camundongos inoculados por via oral com tripomastigotas sanguíneos das cepas colombiana (TcI) e Y (TcII) de *T. cruzi*, utilizando ciclofosfamida (Cy) e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no monitoramento da cura.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O uso, manutenção e cuidados com os animais experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM), protocolo N° 9659251017.

Inoculação dos animais

Foram utilizados camundongos suíços, machos, de 25 a 30 dias, pesando entre 18 a 25 g adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e mantidos durante todo o experimento no biotério do Setor de Parasitologia do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, da mesma instituição. As condições ambientais como temperatura (21 ± 2 °C), umidade (60-70%) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) foram controladas e os animais divididos em gaiolas de polipropileno (Alesco, dimensões de 20 x 32 x 21 cm), com número máximo de 5 animais por caixa, e água e ração à vontade.

Os camundongos foram mantidos em jejum de 12 horas antes de serem inoculados por via oral (gavagem). Dois grupos de 60 animais foram inoculados com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos (TS) / animal provenientes de camundongos previamente infectados, em um volume de 1,0 mL de meio *Liver Infusion and Tryptose* (LIT). Foram utilizadas as cepas Colombiana, classificada como TcI e considerada resistente ao BZ, e Y, genotipada como TcII e parcialmente resistente ao BZ [23].

Grupos experimentais

Para cada cepa, os camundongos foram divididos de acordo com o peso em seis grupos com 10 animais cada. Metade dos animais foi tratada por via oral com BZ na dose de 100 mg / kg / dia por 20, 40 e 60 dias consecutivos (TBZ-20, TBZ-40 e TBZ-60), a partir do 10º dia após inoculação (dai) e a outra metade não recebia o tratamento e constituía os grupos controles não tratados para cada tempo de tratamento (CNT-20, CNT-40 e CNT-60). Uma semana após o fim do tratamento de cada grupo, tanto os animais TBZ quanto

os CNT, eram submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida (Cy) 50,0 mg / kg, por quatro dias consecutivos na primeira semana, e por três dias consecutivos, nas duas semanas seguintes [24].

Taxas de infecciosidade e sobrevida

O animal que apresentou resultado positivo em pelo menos um dos testes realizados (exame de sangue a fresco – ESF, hemocultura – HC, reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR) foi considerado infectado. A taxa de infecciosidade foi obtida pela razão entre o número de animais infectados e o número de animais inoculados x100. A análise da sobrevivência dos animais nos diferentes grupos experimentais foi realizada diariamente ao longo de todo o experimento para se traçar o gráfico de Kaplan-Meier.

Avaliação da eficácia dos tratamentos

Para avaliar a eficácia dos diferentes tempos de tratamento com BZ, os animais foram submetidos ao exame de sangue a fresco, hemocultura e PCR em tempo real do tecido cardíaco e do sangue antes e após imunossupressão com Cy.

Exame de sangue a fresco (ESF)

Foram coletados 5 µL de sangue da veia caudal de cada camundongo, diariamente, a partir do 3º dia até a negatificação por três dias consecutivos, para se avaliar a parasitemia conforme Brener (1962) [25]. Com estes dados era traçada a curva de parasitemia média e obtidos os seguintes parâmetros derivados: (1) período pré-patente (PPP), período que corresponde do dia da inoculação até o primeiro resultado positivo; período patente (PP), período durante o qual era detectada parasitemia; (2) pico máximo de parasitemia (Pmax), que consiste na média calculada a partir do pico de parasitemia detectado para cada

camundongo; dia do pico máximo (DPmax) e área sob a curva de parasitemia (ASC). O ESF foi também utilizado para se confirmar a infecção dos animais inoculados.

Hemocultura

A hemocultura (HC) foi realizada sete dias após o fim tratamento etiológico e antes da imunossupressão, conforme Filardi e Brener (1987) [23]. As amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso retroorbital, inoculadas em meio LIT e incubadas em estufa BOD a 28 °C. Com os resultados desta técnica foi obtido o parâmetro porcentagem dos animais com HC positiva (%HC+).

Obtenção de amostras biológicas para a qPCR

Amostras de tecidos sanguíneo e cardíaco para extração de DNA foram obtidas da seguinte forma: Sete dias após o fim do tratamento com BZ e antes de submeter os animais à imunossupressão, 400 µL de sangue eram coletados do plexo retroorbital dos animais e adicionados a 35 µL de citrato de sódio. Outros 400 µL de sangue foram coletados da mesma forma, no sétimo dia após o término da imunossupressão, assim como o coração, coletado *in totum* e congelado no freezer à -80 °C até o uso.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada para detecção de DNA de *T. cruzi* e quantificação da carga parasitária sanguínea e do tecido cardíaco. O DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio, como descrito por Caldas et al. (2012) [26] e modificado por Gruending et al. (2015). O DNA obtido foi analisado através do kit QuantiNova SYBR Green PCR (Quiagen) com 100 ng de DNA genômico total, utilizando os iniciadores TCZ-F (5' –GCTCTTGCCCACAMGGGTGC– 3') e TCZ-R (5' –

CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG– 3') [26]. As amostras foram amplificadas em LightCycler® 480 mediante desnaturação a 95 °C durante 2 min, 35 ciclos de amplificação a 95 °C durante 15 segundos, e 60 °C durante 10 seg. Para monitorar os dímeros de iniciadores ou a formação de produtos não específicos, foi realizada a análise da curva de fusão de 65 °C a 97 °C ao final de cada ensaio.

Foi estabelecida uma curva padrão usando DNA purificado de *T. cruzi*; diluições em série variando de 100 a 0,001 ng de DNA foram adicionadas aos poços da placa de reação em triplicata. A curva padrão foi gerada pelo *software* LightCycler® 96 e utilizada para calcular a relação equivalente parasito em cada amostra. O equivalente parasito foi baseado na quantidade de DNA por célula epimastigota, onde foram considerados 200 fg / parasito [27]. Com esses resultados obteve-se a porcentagem de camundongos com qPCR positiva (%qPCR+) e a média da carga parasitária (CP) em equivalente parasito por mL (Eq. par/mL) para cada grupo experimental.

Tratamento estatístico

Os dados foram distribuídos em tabelas de frequência e descritos em termos de porcentagens ou médias. As análises estatísticas foram realizadas no programa Bioestat 5.0 (Belém, Pará, Brasil), com nível de significância de 5%. As proporções foram comparadas usando o teste qui-quadrado e as médias foram comparadas utilizando os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

A taxa de infecciosidade (%INF) dos animais inoculados com a cepa TcI foi de 50%, considerando ESF e HC, sem os dados da qPCR. Nos animais inoculados com a cepa TcII a %INF foi de 100%, uma vez que todos os animais apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos testes utilizados (ESF, HC e/ou qPCR).

Curvas de parasitemia

As curvas de parasitemia média obtida a partir dos resultados do ESF estão apresentadas na figura 1 para os grupos de animais infectados com a cepa colombiana (TcI) (Figura 1a) e Y (TcII) (Figura 1b) de *T. cruzi*, respectivamente.

Pela análise do gráfico da figura 1a pode-se observar que os animais infectados com TcI e que não receberam o tratamento etiológico (CNT) apresentaram PMax de 9×10^3 tripomastigotas sanguíneos (TS)/0,1mL de sangue e Dpmax em torno do 20º dai. Para os animais CNT inoculados com TcII (Figura 2b), o PMax foi de $1,4 \times 10^5$ TS / 0,1 mL de sangue e o Dpmax ocorreu no 12º dai.

Os parâmetros derivados da curva de parasitemia média dos animais inoculados com as duas cepas de *T. cruzi* estudadas, tratados com BZ e CNT, estão apresentados na tabela 1. Na comparação entre as cepas, dos animais CNT, pode-se observar que aqueles inoculados com a cepa colombiana (TcI) apresentaram maior PPP, Pmax mais tardio, menores valores de PP, Pmax e ASC do que aqueles inoculados com a cepa Y (TcII) ($p < 0,05$), exceto o Pmax ($p = 0,11$) e o PP ($p = 0,15$) dos animais CNT-40 (Tabela 1). Esses achados sugerem maior virulência da cepa TcII em comparação com a cepa TcI na infecção oral experimental com TS. Na comparação entre os animais CNT e TBZ, tanto dos infectados com a cepa Y ($p < 0,05$) como os infectados com a cepa Colombiana ($p = 0,0036$), pode-se verificar que o tratamento promoveu redução dos valores de todos estes parâmetros, indicando ampla ação tripanocida do BZ nas formas TS.

A comparação da ASC entre os grupos TBZ e CNT, infectados com a mesma cepa, mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$), indicando redução deste parâmetro pelo tratamento. Quando o mesmo parâmetro é considerado na comparação entre grupos CNT das duas cepas, também é observada diferença estatística, sendo a ASC dos infectados

pela cepa colombiana ($2,2 \pm 1,3$) menor ($p=0,0001$) que a dos infectados com a cepa Y ($45,73 \pm 16,56$) (Tabela 1).

Positividade da hemocultura e sobrevida

As taxas de hemocultura positiva (%HC+) dos camundongos dos diferentes grupos experimentais são apresentadas na figura 2. As %HC+ dos camundongos inoculados com a cepa TcI variam de 0% (CNT-60) a 20% (CNT-20 e CNT-40) nos controles e 0% nos grupos tratados (TBZ), enquanto que os inoculados com a cepa TcII apresentaram variaram de 50% (CNT-40) a 100% (CNT-20) para os grupos controles e de 20% (TBZ-20) a 80% (TBZ-60) para os grupos tratados.

As taxas de sobrevivência dos animais inoculados com a cepa colombiana foram de 80% (CNT- 40 e 60) nos controles e de 100% nos grupos tratados. Nos animais inoculados com a cepa Y, a sobrevida variou de 30 a 50% (CNT) e de 80 a 100% nos grupos tratados (TBZ). Na comparação das taxas de sobrevivência entre os animais inoculados com as duas cepas observa-se que os grupos infectados com a cepa colombiana apresentaram maiores valores em relação aos infectados com a cepa Y (Figura 3). Quando comparados os grupos CNT e TBZ para a mesma cepa, as taxas de sobrevida dos animais TBZ foram superiores aos animais do CNT para ambas as cepas.

Positividade da PCR em tempo real e carga parasitária

A figura 4 apresenta a CP em termos de equivalente parasito nos tecidos dos camundongos infectados com a cepa Y. No sangue, antes da imunossupressão com Cy, a CP variou de 3,5 Eq. par/mL (CNT-60) a 6,5 Eq. par/mL (CNT-40) (figura 4a) e após a imunossupressão, de 8500 Eq. par/mL (TBZ-40) a 9000 Eq. par/mL (CNT-40) (figura

4b). A %qPCR foi de 100% positiva para todos os grupos inoculados, com a persistência de DNA do parasito no sangue circulante antes e após a imunossupressão com Cy para todos os tempos de tratamento, com aumento significativo na CP sanguínea pós imunossupressão, confirmando a reativação da infecção. No coração, a CP variou de 5,0 Eq. par/mL (CNT-40) a 6,5 Eq. par/mL (CNT-20) (figura 4c). A persistência de DNA do parasito também é verificada nas amostras de tecido cardíaco de todos os grupos após a imunossupressão, sem diferenças estatísticas entre eles ($p=0,66$), indicando que a carga parasitária (CP) semelhante após imunossupressão dos animais TBZ e CNT. Não foram obtidos dados da CP cardíaca antes da imunossupressão uma vez que era necessária a eutanásia do animal. Os danos teciduais, principalmente no fígado, causados pelos diferentes tempos de tratamento com BZ na infecção por VO com formas TS das cepas TcI e TcII deste estudo não foram avaliados no presente estudo.

DISCUSSÃO

A ocorrência de infecção oral pelo *T. cruzi* via consumo de alimentos contaminados com o parasito tem se acentuado nas últimas décadas. No Brasil, entre os anos 2000 e 2017, 69% dos novos casos registrados de DC foram adquiridos por via oral, sendo esta via de infecção mais severa e letal [28-30]. Por outro lado, a busca por moléculas mais eficazes no tratamento da DC tem sido realizada, mas sem perspectivas promissoras até o momento. Assim, o uso de novos esquemas terapêuticos com os fármacos disponíveis torna-se necessário, com vistas à cura ou ao prolongamento da sobrevida dos pacientes.

Usado desde a década de 70, o pró-farmaco BZ é a única droga disponível no mercado brasileiro para o tratamento da DC. Sua ação tripanocida deve-se à citotoxicidade causada por seus metabólitos, derivados principalmente pela ação das nitroreduases, presentes no parasito (tipo I) e em humanos (tipo II), que reduz o grupo nitro da droga a um grupo amino, produzindo radicais livres e metabólitos eletrofílicos. A nitroreductase tipo I é a

responsável pela ação tripanocida, enquanto o tipo II está envolvida nos efeitos colaterais e toxicidade do BZ [21,31].

No presente trabalho, a cepa TcII mostrou-se mais virulenta e letal que a cepa TcI nos animais inoculados com as formas TS por VO, apresentando maiores níveis de parasitemia e mortalidade, o que é consistente com outros estudos realizados com essas mesmas cepas [19] e com camundongos inoculados por via IP com cepas das mesmas DTU [32]. A diferença na infeciosidade entre TcI e TcII deste estudo pode estar relacionada às características biológicas de cada cepa, como as relacionadas à expressão da proteína gp85 e mucinas, presentes em grande quantidade nas formas TS e responsáveis pela adesão e penetração do *T. cruzi* nas células de mamíferos [33,34]. Observamos também que tanto os animais infectados com a cepa TcI como os infectados com a cepa TcII, e tratados com BZ, tiveram aumento na sobrevivência em todos os tempos de tratamento, devido à supressão da parasitemia, mesmo que a cura não tenha sido alcançada. Estes achados corroboram com outros autores, que observaram que as formas TS são mais suscetíveis ao BZ do que as formas amastigotas e a diminuição de lesões em órgãos alvos devido a injúria celular, causada por processos inflamatórios em animais infectados com as mesmas cepas, estendendo a sobrevivência dos animais tratados na fase aguda da doença [32, 35].

Os animais de todos grupos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* por VO e tratados com BZ, apresentaram falha terapêutica, comprovada pela presença do DNA do parasito do sangue e tecido cardíaco detectados na qPCR (100% positivos) do sangue antes e após imunossupressão, que mostrou a reativação da infecção após imunossupressão, com aumento de 20 vezes na CP demonstrada pela qPCR, indicando a persistência de parasitos da cepa Y (TcII), mesmo com o prolongamento do tempo de tratamento com o BZ de 20 para 40 e 60 dias consecutivos. Estes resultados diferem de outros estudos que utilizaram

as mesmas cepas, tripomastigotas da mesma origem (TS) e curso de tratamento de 40 dias. Porém, em nenhum desses estudos os animais foram inoculados pela via oral [21,22].

Além da infecção por via oral se mostrar mais severa [20], o fígado é significativamente mais afetado na infecção por via oral com o *T. cruzi* em comparação com a via intraperitoneal, majoritariamente utilizada nos modelos experimentais [36]. Sabe-se também do elevado tropismo tecidual da cepa Y pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), especialmente o fígado [37]. Tanto animais inoculados por via IP com as mesmas cepas (Y e Colombiana) e inóculo [21,22] quanto aqueles inoculados por via oral com tripomastigotas derivados de cultura acelular da cepa AM14 (TcIV, de baixa virulência e sem tropismo para a fígado [38], mostraram aumento na eficácia do BZ devido ao aumento no tempo de tratamento. Os primeiros autores obtiveram aumento na eficácia para a cepa colombiana inoculada por via IP (de 0 para 50%) e o segundo obteve 25%, com a cepa AM14 e início do tratamento no quinto dia após inoculação. Estes dados sugerem que tanto a diferença genética entre as DTU de *T. cruzi*, o que repercute em suas propriedades biológicas, quanto à forma infectante presente no inóculo, tenham influenciado na resposta ao tratamento com BZ dos animais, assim como o tempo de início do tratamento. O início tardio do tratamento na fase aguda permite que o TS infecte maior quantidade de células do mamífero, ou seja, com infecção já estabelecida, aumentando também a quantidade de formas AMA, que são menos suscetíveis à ação do BZ in vivo. Em nível celular, o *T. cruzi* é capaz de modular genes específicos para sua própria proteção e replicação no ambiente intracelular do hospedeiro, promovendo adaptabilidade genética, que pode levar à resistência do parasito ao fármaco [39]. No entanto, salientamos que o mecanismo de resistência do parasito ao BZ é um processo complexo e com diversos mecanismos envolvidos.

O BZ administrado por via oral é absorvido no intestino, seguindo para o fígado, onde sofre metabolismo de primeira passagem principalmente pela ação da enzima P450 redutase e nitroredutase II, gerando radicais livres de oxigênio e nitrogênio e causando estresse oxidativo, o que está relacionado com a toxicidade hepática do fármaco. O tropismo de *T. cruzi* pelo tecido hepático já é conhecido, em especial de TcII, como a cepa Y, causando danos ao órgão [40]. Tanto a infecção pelo *T. cruzi* quanto a terapia com o BZ, isoladamente, são capazes de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes e liberação de enzimas hepáticas, indicando estresse oxidativo, que ao promover oxidação de lipídeos e de proteínas hepática, causa lesões no fígado. Quando combinados, a infecção pelo *T. cruzi* e a administração do BZ podem aumentar a gravidade da lesão hepática, derivada, possivelmente, do estresse oxidativo desencadeado pelo curso natural da infecção e pelo metabolismo do fármaco [41]. A não realização das análises histológicas e bioquímicas relacionadas à função hepática no presente estudo tornou-se um fator limitante do mesmo, já que não foi possível determinar até que ponto a infecção do órgão pelo parasita pode influenciar no metabolismo do BZ, assim como o possível efeito chicote da toxicidade do BZ no metabolismo do fármaco.

Um estudo da farmacocinética do BZ realizado por Perin (2017) [42], mostrou que o BZ administrado por VO apresenta rápida absorção, porém em níveis baixos. Apresentou ainda ampla distribuição plasmática, no coração, fígado e cólon, órgãos alvos de *T. cruzi* e locais de ação do BZ na fase crônica da DC. O BZ administrado por VO apresentou, também, meia vida curta, indicando metabolismo elevado no fígado, gerando metabólitos que são eliminados rapidamente pelos rins. Com base nestas informações e nos resultados obtidos no presente estudo, acredita-se que a baixa atividade do BZ sobre as formas AMA do parasito deve-se, em parte, à baixa biodisponibilidade da droga, podendo ser

influenciadas também pelas características biológicas do parasito [43], forma infectante presente no inóculo [38] e as condições do hospedeiro mamífero [44].

Estudos apontam que o longo período de tratamento com o BZ promove a diminuição da absorção, aumento da eliminação e biotransformação, além de agravar a lesão hepática [45]. Recentemente foi mostrado uma super-expressão de genes relacionados ao transporte de drogas, como o da glicoproteína-P (P-gp) e da Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplos fatores (MRP2) e de enzimas de biotransformação como glutathione S-transferase (GTSP), em macrófagos infectados com a forma AMA de *T. cruzi* e tratados com BZ [46]. A P-gp e MRP2 podem ainda ter a sua expressão aumentada na membrana de enterócitos, de células musculares e macrófagos quando do prolongamento do tempo de tratamento com o BZ por via oral, diminuindo sua absorção intestinal e aumentando o efluxo do BZ, o que leva a diminuição da biodisponibilidade do fármaco principalmente contra a forma AMA, já que as células do hospedeiro mamíferos aumentam o efluxo da droga [47,48]. O insucesso do BZ pode estar relacionado ainda ao estado de dormência que algumas AMA realizam, permitindo que estas formas não sejam “atacadas” pelo fármaco [49].

É relatado também as diferentes respostas que os hospedeiros mamíferos possuem frente ao BZ, que possui biotransformação mais lenta quanto menor for a idade, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e diminuindo os efeitos colaterais, devido à escassez da nitroreductases II e baixa atividade da P450 e P450-redutase em recém-nascidos [44]. Esses fatores em conjunto promovem a diminuição da biodisponibilidade do BZ, afetando a eficácia do fármaco, limitando principalmente a sua ação sobre as formas AMA tecidual, principalmente na infecção por VO, uma vez que ao contrário de outros autores que observaram o aumento na eficácia do BZ na infecção experimental com o *T. cruzi* com o aumento do tempo de tratamento, o que não ocorreu no presente estudo.

CONCLUSÃO

A alteração do regime de tratamento aumentando o seu tempo de 20 para 40 e 60 dias em camundongos infectados por via oral com formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Colombiana (TcI) e Y (TcII) de *T. cruzi* não resultou em aumento da eficácia do BZ. Podemos concluir que o aumento da eficácia do fármaco com o aumento do tempo de tratamento, irá depender tanto da via de inoculação quanto da cepa de *T. cruzi* envolvida.

Mesmo não apresentando eficácia na infecção experimental murina por via oral com as cepas Colombiana (TcI) e Y (TcII) de *T. cruzi*, a relação risco benefício no uso prolongado do BZ ainda se mostra favorável, trazendo benefícios como a supressão da parasitemia e o aumento da sobrevida dos animais tratados.

CONFLITOS DE INTERESSES

O autor declara que não há conflitos de interesses no presente estudo.

SUPORTE FINANCEIRO

Este projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dias JCP, Júnior ANR, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. *Epidemiol Serv Saude* 2016; 25: 7-86.
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanomiasis) 2018. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> (Acesso em 08/09/2018)
- [3] Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(7):1051-1054.
- [4] Toledo MJO, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, Lana M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47 .2003; 223-230.
- [5] Teston, APM, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GD, Gomes ML, Araújo SM, et al. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health* 2013; 18 (1):85-95.
- [6] Noireau F, Cortez MRG, Monteiro FA, Jansen AM, Torrico F. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts?. *Trends Parasitol*. 2005; 21(1):7-10.
- [7] Marin-Neto JÁ, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease" *Circulation*. 2007; 115 (9):1109-1123.
- [8] Biolo, A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010; 52.4 300-316.

- [9] Rassi-Jr A, Rassi A, Marinaseto JA. Chagas disease. *The Lancet*. 2010 375(9723): 1388-1402.
- [10] Andrade LO, Galvão L, Meirelles MDNS, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(6): 834-837.
- [11] Brener Z, Romeu CJ. Terapêutica experimental. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte (1968)
- [12] Coura, JR. Tripanosomose, doença de Chagas. *Ciência e Cultura*. 2003; 55(1): 30-33.
- [13] Castro JA, Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25(8):471-479.
- [14] Silveira ANC, Castillo E, Castro C. Specific treatment evaluation for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (2):191-196.
- [15] Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*. 2010; 115(2):55-68.
- [16] Bocchi EA, Bellotti G, Uip D, Kalil J, De Lourdes HM, Fiorelli A, et al. Long-term follow-up after heart transplantation in Chagas disease. *Transplant Proc*. Vol. 25. No. 1 Pt 2. 1993.
- [17] Marin-Neto JA, Jr AR, Jr AA, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:319-324.
- [18] Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González C, Zamora J, López-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: a systematic review with a metaanalysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64 (6):1139-1147.

- [19] Dias GBM, Gruending AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJO. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol.* 2013; 135 (3):511-517.
- [20] Teston APM, Abreu AP, Abegg CP, Gomes ML, Toledo, MJO. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. *Acta tropica.* 2017; 166: 212-217.
- [21] Bustamante JM, Craft, JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis.* 2014; 209 (1):150-162.
- [22] Mazzeti AL, Diniz LDF, Gonçalves KR, Nascimento AF, Spósito PA, Mosqueira VC, Bahia MT. Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: a pre-clinical study. *Biochem Pharmacol.* 2018; 148:213-221.
- [23] Filardi LS, 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.* 1987; 81(5):755-759.
- [24] Diniz LAS, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TAF, Caldas IS, Bahia MT. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2367.
- [25] Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1962;4(6): 389-96.
- [26] Caldas S, Figueiredo DL, Lima WG, Oliveira PO, R., Cecílio AB, Bahia, MT. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop.* 2012; 123 (3):170-177.

- [27] Duffy, T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3 (4):419.
- [28] Marcili A, Valente as, Valente SA, Junqueira AC, Silva FM, Neves Pinto AY, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol*. 2009; 39 (5): 615-623.
- [29] Brasil, Ministério da Saúde (2013). SAÚDE BRASIL 2017. Uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza. Available in: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2017_analise_situacao_saude.pdf>
- [30] Monteiro WM, Teston APM, Gruendling AP, Reis D, Gomes ML, Araújo SM, et al., *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7 (2):2069.
- [31] Hall, BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* 2011; 286(15) 13088-13095.
- [32] Gruendling AP, Massago M, Teston A P M, Monteiro W M, Kaneshima EN, Araújo SM, et al. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 92 (6):1178-1189.
- [33] Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W. et al. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 65(1):85-94.
- [34] Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*. 2006; 78(1):87-111.

- [35] Docampo R, Moreno SNJ. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis*. 1984; 6(2):223-238.
- [36] Barreto-de-Albuquerque J, Silva DS, Pérez, AR, Berbert, LR, Vliet ESV, Oliveira DAF, et al. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease form from an old infection?. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(6):e0003849.
- [37] Melo RC, & Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol* 1978; 475-482.
- [38] Zanusso Jr GZ, Massago M, Kian D, Toledo MJO. Efficacy of essential oil of *Syzygium aromaticum* alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with *Trypanosoma cruzi* IV. *Exp Parasitol*. 2018; 185: 92-97.
- [39] Murta, SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, et. al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2006; 146(2): 151-162.
- [40] Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(10):819.
- [41] Novaes RD, Santos EC, Cupertino MC, Bastos DS, Oliveira JM, Carvalho TV, et al. *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. *Parasitol Res*. 2015; 114(8):2873-2881.
- [42] Perin L, Silva RM, Silva KF, Cardoso JMO, Mathias FAS, Reis LES, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(4): e02410-16.

- [43] Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JCO, Carneiro CM, Machado-Coelho GLL. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes." *Journal of antimicrobial chemotherapy* .2008; 61(6): 1319-1327.
- [44] Bulffer RF, Castro JA, Fanelli SL. Benznidazole levels in blood vary with age in rats. *Mem do Instit Osw Cruz*.2011; 106(3): 374-377.
- [45] Perdomo VG, Rigalli JP, Villanueva SSM, Ruiz ML, Luquita MG, Echenique CG, et al. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57:4894–902.
- [46] Téllez J, Romanha AJ, Steindel M. Drug transporter and oxidative stress gene expression in human macrophages infected with benznidazole-sensitive and naturally benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites treated with benznidazole. *Parasit Vectors*. 2019; 12(1):262.
- [47] Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:5022–7.
- [48] Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D et al. Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12) e1951.
- [49] Sánchez-Valdéz FJ, Padilla A, Wang W, Orr D, Tarleton, RL. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*. 2018; 7: e34039.

ANEXO I

Figura 01: Curvas de parasitemia média de camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* TcI (a) e TcII (b), tratados com benznidazol 100 mg/kg/dia por 20 (TBZ-20), 40 (TBZ-40) e 60 (TBZ-60) dias consecutivos, a partir do 10º dia após a inoculação e controles não tratados (CNT). Inóculo: 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos/animal.

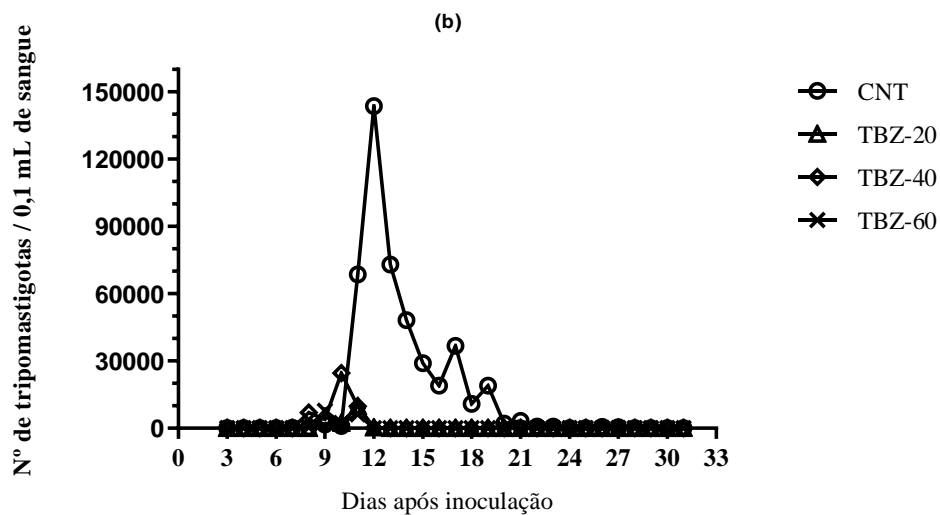
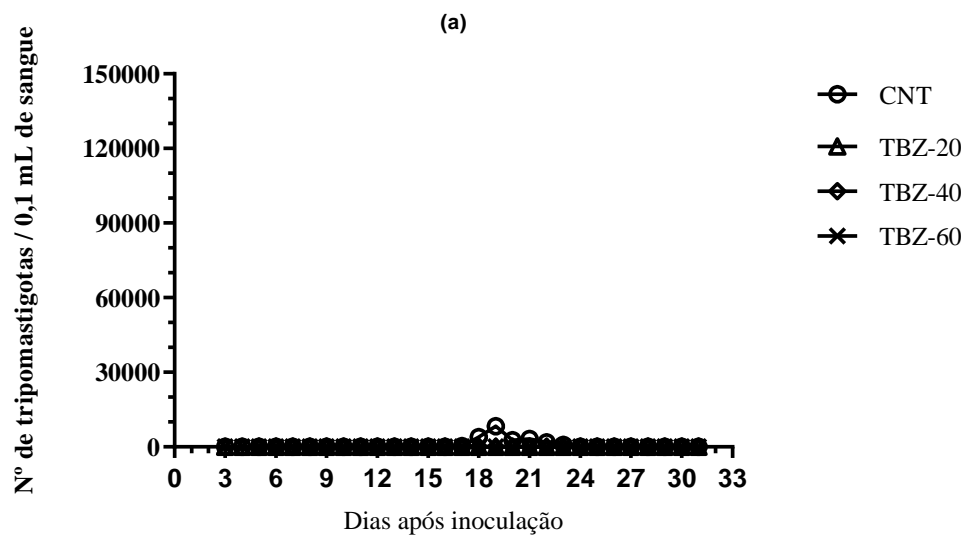


Tabela 1: Média e desvio padrão dos parâmetros parasitológicos derivados das curvas de parasitemia de camundongos inoculados por via oral com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*, cepas colombiana (TcI) e Y (TcII) tratados com benzonidazol (TBZ) 100 mg/kg/dia por 20, 40 e 60 dias consecutivos e controles não tratados (CNT). Início do tratamento: 10º dia após a inoculação.

Parâmetros	TcI				TcII			
	CNT	TBZ-20	TBZ-40	TBZ-60	CNT	TBZ-20	TBZ-40	TBZ-60
PPP ^a (em dias)	17,7±0,7	0,0	0,0	0,0	10,3±0,9	9,4±0,9	8,6±0,8*	9,2±1,2
PP ^b (em dias)	0,5±4,8	0,0	0,0	0,0	8,9±1,9	1,9±1,1*	2,5±0,9*	1,9±1,1*
Pmax ^c ($\times 10^4$)	0,9±8,5	0,0	0,0	0,0	16,4±4,2	1,6±0,3*	1,5±1,7*	1,3±1,0*
DPmax ^d (dia)	22,0±0,0	0,0	0,0	0,0	12,3±0,9	10,2±1,1*	9,9±1,0*	10,3±0,8*
ASC ($\times 10^4$)	2,2±1,3	0,0	0,0	0,0	45,7±16,6	1,7±0,2*	4,5±0,4*	1,6±0,2*

* diferença significativa entre tratados e não tratados ($p < 0.05$); ^a: Período pré-patente; ^b: período patente; ^c: pico máximo de parasitemia em número de tripomastigotas / 0,1 mL de sangue; ^d: dia do pico máximo; ASC: área sob a curva.

Figura 2: Porcentagem de Hemocultura positiva (%HC+) em camundongos suíços inoculados por via oral com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* TcI (a) e TcII (b) cepas colombiana (TcI) e Y (TcII) tratados com benzonidazol (TBZ) 100 mg/kg/dia por 20, 40 e 60 dias consecutivos e controles não tratados (CNT). Início do tratamento: 10º dia após a inoculação

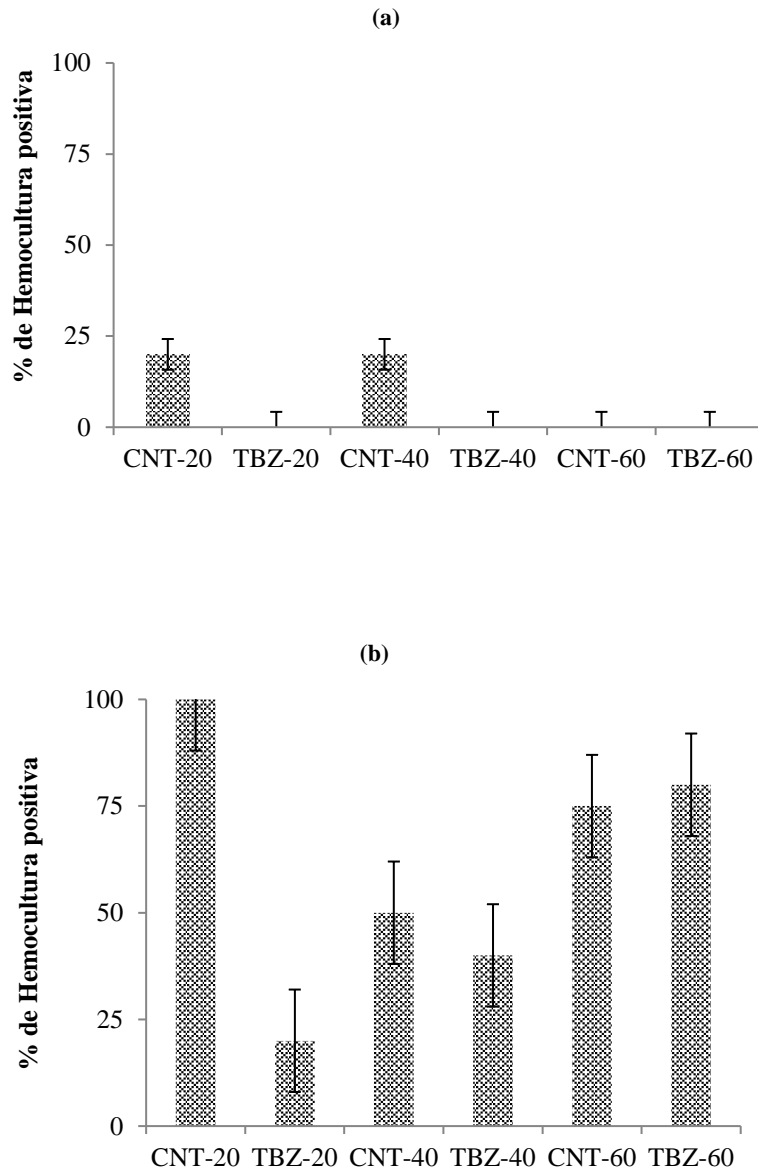


Figura. 3. Curva de Kaplan-Meier com a taxa de sobrevivência de camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi* TcI (a) e TcII (b), tratados com 100 mg / kg / dia com benzonidazol (BZ), por 20 dias consecutivos (TBZ-20), 40 dias consecutivos (TBZ-40) e 60 dias consecutivos (TBZ-60) e em controles não tratados (CNT-20, CNT-40, CNT-60). Inóculo: 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas / animal. Início do tratamento: 10º dia após a inoculação.

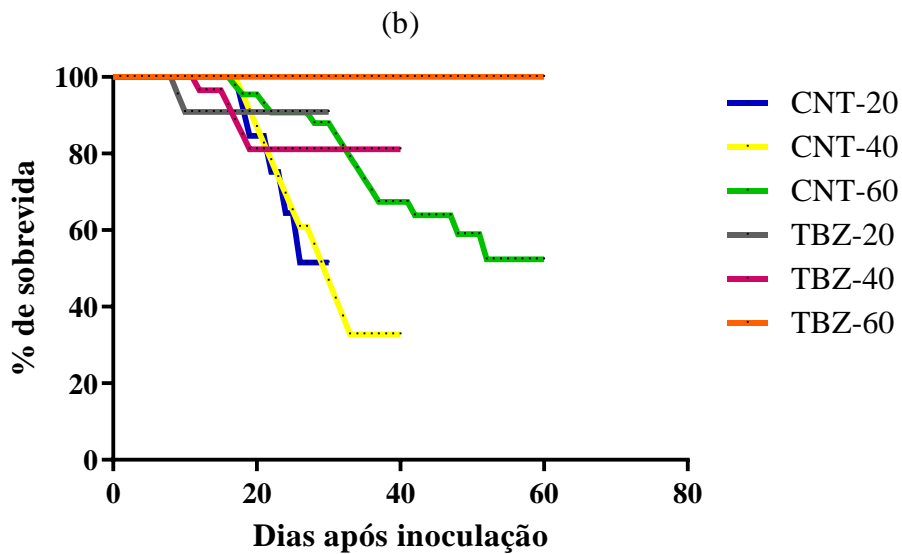
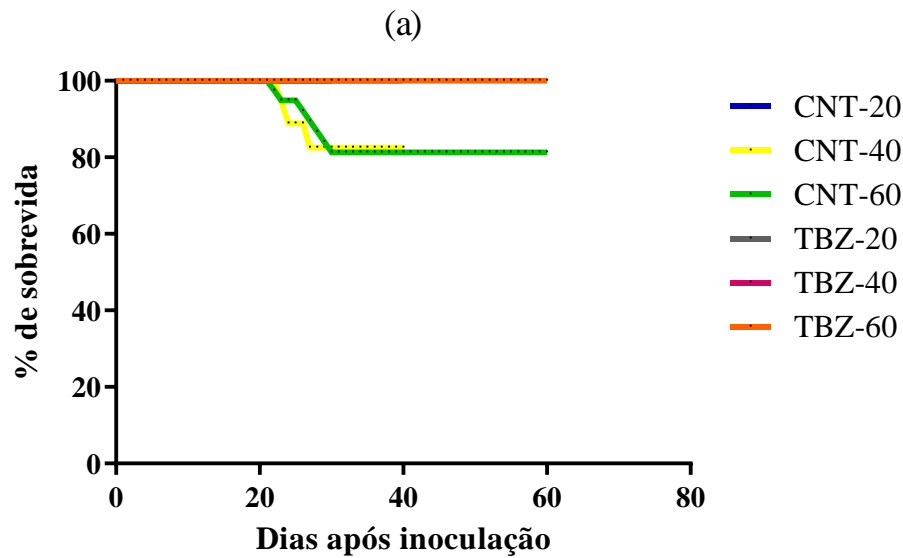
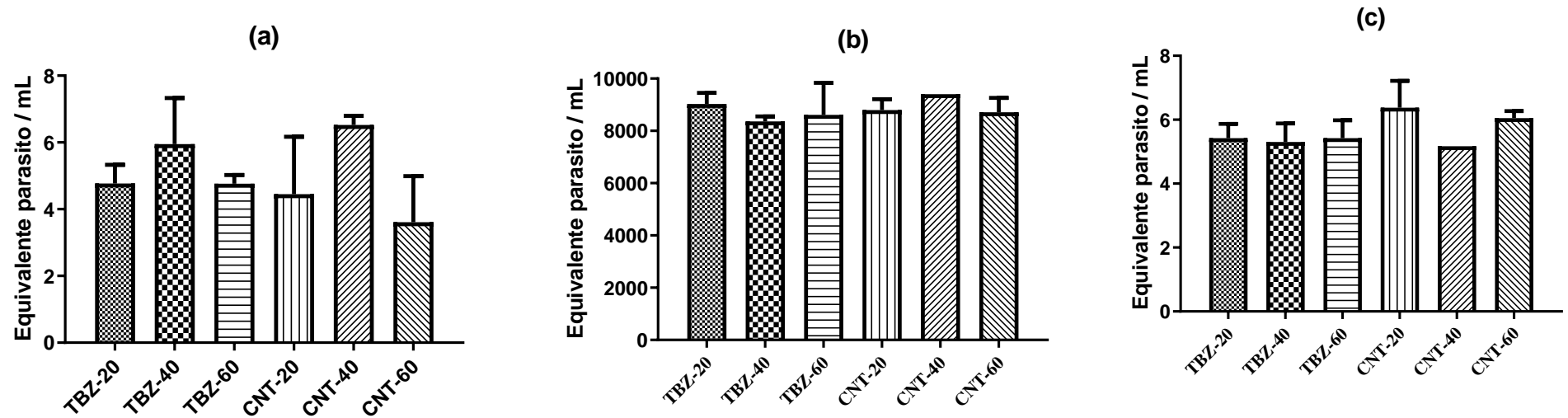


Figura 4: Carga parasitária média detectada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em camundongos inoculados pela via oral (VO) com 1×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepas Y (TcII) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol (BZ) (100 mg / kg / dia) por 20, 40 e 60 dias, e em controles não tratados (CNT). Em sangue coletado antes (a) e após imunossupressão (b) com ciclofosfamida (50 mg / kg , 3 semanas) e em coração (c).



ANEXO II

Normas da revista:



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Política de avaliação](#)
- [Tipos de manuscrito](#)
- [Preparação do manuscrito](#)
- [Formatação do manuscrito](#)
- [Workflow](#)

ESCOPO

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é um periódico multidisciplinar, com acesso aberto, que publica pesquisas originais e estudos clínicos sobre Medicina Tropical (incluindo Epidemiologia, Patologia, Imunologia, etc.) e doenças infecciosas. É um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Os artigos de revisão são a convite do Editor, mas também publica artigos originais, comunicações breves, relatos de caso, editoriais, cartas ao editor, imagens em doenças infecciosas e parasitárias, relatórios técnicos e números especiais (suplementos). A Revista possui um sistema de revisão por pares, é publicada em inglês e sua periodicidade é bimestral e o conteúdo é de acesso livre para os leitores e nenhuma taxa é cobrada dos autores.

Considerando que a partir de 2016, a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical apenas recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), não tendo recebido fomento de nenhum outro órgão. O suporte financeiro foi essencial para garantir a qualidade, a melhoria do fator de impacto, número de citações, a geração do XML e revisão/edição do inglês em todos os artigos aceitos, que foram pagos pela própria revista.

A partir de 2017, a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical estabeleceu que, quando necessário, solicitará gentilmente aos autores que paguem pelo serviço profissional de revisão e edição do inglês realizado por uma empresa especializada, na versão final de seus manuscritos aceitos para publicação.

POLÍTICA DE AVALIAÇÃO

Submissões à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical indicam que não foram publicadas anteriormente (exceto resumo) e que não estão sendo consideradas para publicação em outro periódico.

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação em nosso periódico, são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria, quanto à adequação às normas. Em seguida, se estiverem dentro das Normas para Publicação, serão encaminhados, no mínimo, para dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado através do sistema de revisão por pares. Os editores, com base no parecer dos revisores, irão decidir quanto à aceitação ou não do manuscrito. Se houver divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro revisor para validar a decisão editorial final de acordo com o fluxograma da Revista, disponível no seguinte endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>

Os manuscritos devem ser escritos em Inglês e submetidos apenas eletronicamente através do endereço: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

A baixa qualidade do inglês é a maior causa de atraso na publicação. Recomendamos fortemente aos autores, com inglês como língua estrangeira, que seus manuscritos sejam preferencialmente traduzidos e editados por um serviço profissional de inglês ou verificados por um cientista com inglês como primeira língua, e uma cópia do certificado deve ser enviada para a Revista.

O contato com a Secretaria da Revista pode ser estabelecido no endereço abaixo:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Av. Getúlio Guaritá s/n, Caixa Postal: 118, CEP: 38001-970 Uberaba, Minas Gerais, Brasil

Tel: 55 34 3318-5287; Fax: 55 34 3318-5279

e-mail: rsbmt@rsbmt.uftm.edu.br; <http://www.scielo.br/rsbmt>

TIPOS DE MANUSCRITO

A Revista convida à publicação Artigos Originais, Artigos de Revisão e Minirrevisões, Editoriais, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas e Números Especiais.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O

Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo com até 250 palavras (não estruturado). Cinco ilustrações são permitidas (tabelas e figuras). São publicadas também minirrevisões. Minirrevisões têm no máximo 3.000 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo (não estruturado) com até 200 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo não estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. As comunicações breves devem ter no máximo 2.000 palavras (excluindo resumo, título e referências); Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é

permitido. Até três palavras-chaves devem ser fornecidos. O corpo do manuscrito não devem conter subdivisões ou subtópicos. Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro devem ser incluídos.

Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras (excluindo título, resumo e referências), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo não estruturado com no máximo 100 palavras e três palavras-chaves. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo, Palavras-Chaves, Texto do Manuscrito (Introdução, Relato de Caso, Discussão), Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro devem ser incluídos.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de *experts*. Será considerado, se formatado como um editorial.

Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Até três autores e até três referências são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras (excluindo título e referências) com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras.

Cartas: leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da Revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (figura ou tabela) e pode tratar de material anteriormente publicado na revista, com até 12 referências.

Números Especiais: Propostas de números especiais devem ser feitas ao o Editor e/ou Editor Convidado. A proposta será analisada levando em consideração o tema, organização do programa ou produção de acordo com escopo da revista.

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores reservam-se o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

Sistema de Submissão *on-line*: Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão *on-line* no endereço: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>. O autor deve escolher dentro do item “Tipos de Manuscrito” uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Réplica à Carta ou Outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Carta de Apresentação: a) deve conter uma declaração, assegurando de que se trata de pesquisa original e que, ainda, não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar pelos outros co-autores, mediante procuração.

c) Os autores devem incluir na *Cover Letter* uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

d) Devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Contribuição dos autores: Os autores devem incluir, em documento separado, uma declaração de responsabilidade especificando a contribuição, de cada um, no estudo.

Edição da Pré-Submissão: todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser em inglês. É altamente recomendável que os autores utilizem os serviços de uma empresa profissional de edição e/ou tradução. A revisão/edição da língua inglesa não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

FORMATAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *Times New Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Declaração de Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito deve ser limitada ao número real de autores que realmente contribuíram com o manuscrito, exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, que devem limitar-se a vinte autores. Quando exceder a vinte autores, o restante será publicado em notas de rodapé.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de instituições diferentes dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 40 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos, em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista. No caso de pesquisa em seres humanos, os autores devem incluir na seção métodos no subtítulo Considerações Éticas uma declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separados por vírgula ou por hífen quando houver uma sequência sem intervalo. Ex.: Mundo^{1,2}; Vida^{30,42,44-50}. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus* (Consulte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

A responsabilidade pelas citações bibliográficas contidas no texto e na lista de referências recai exclusivamente sobre os autores.

Alguns exemplos de referências:

1. **Citação de Artigos em Geral:** Sobrenome seguido das iniciais dos seis primeiros autores. Para sete ou mais autores, liste os seis primeiros, seguidos de "et al."), título completo do artigo (no idioma original), título abreviado do periódico (pode ser encontrado Em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), ano de publicação, volume (número), páginas inicial e final abreviada.

Exemplo 1: Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. Arch Neurol. 2005;62(1):112-6.

Exemplo 2: Freitas EC, Oliveira MF, Vasconcelos ASOB, Filho JDS, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;50(1):115-21.

2. **Capítulo de livro:** Sobrenome seguido das iniciais dos autores do capítulo, título completo do capítulo, editores, título do livro, Edição, local de publicação: editor, ano de publicação, páginas inicial e final do capítulo abreviada.

Exemplo: Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. Equalities and inequalities in health. 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.

1. **Livro:** Sobrenome seguido das iniciais dos autores do livro, título do livro, edição, local de publicação: editor, ano de publicação e número de páginas do livro.

Exemplo: Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.

4. **Sites:** Nome do autor/organização. Título da página [Internet]. Local de publicação: Nome do editor; Data ou ano de publicação [atualizado ano mês dia; Citado ano mês dia]. Disponível em: endereço.

Exemplo: Diabetes Australia. Diabetes globally [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/DiabetesGlobally/>

5. **5. Dissertação/Tese:** A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não aceitará a citação de dissertação/mestrado, teses de doutorado ou similar.

Ilustrações: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, pela primeira vez, em ordem numérica crescente.

Título e Legendas: devem ser digitados com espaçamento duplo no final do manuscrito.

Dimensões: As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

- **Imagens/Fotografias:** devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato *TIFF*. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima

de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (*Adobe Photoshop, Corel Photo Paint, etc.*).

- **Gráficos:** Devem ser criados usando software estatístico e devem ser salvos/exportados com a extensão original (**.xls, .xlsx, .wmf, .eps ou .pdf**).
- **Mapas:** devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os *softwares Corel Draw ou Illustrator* em alta resolução.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer abaixo da mesma. O significado de todas as siglas e símbolos utilizados na tabela devem constar no rodapé da tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, em ordem numérica crescente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte *Times New Roman*, tamanho 9.

Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

1. Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.
2. Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las assim que possível.
3. Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.
4. Todos os artigos aceitos que ainda não tenham sido impressos estarão disponíveis on-line enquanto aguardam publicação na versão impressa (*ahead of print*).

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não indica qualquer tipo de serviços de tradução.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.

WorkFlow

***Workflow* do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão *online* no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>.

Política de Revisão do Periódico (*workflow*):

1. Todos os manuscritos submetidos para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são inicialmente avaliados pela Secretaria quanto à adequação do texto às normas do periódico.
2. Após esta etapa, os manuscritos adequados às Normas Para Publicação da Revista serão avaliados pelo Editor ou Editores Associados quanto ao escopo e a política editorial do periódico. A Secretaria envia o manuscrito para o Editor-Chefe.
3. O Editor-Chefe designa um Editor Associado ou designa revisores.
4. O manuscrito será enviado a pelo menos dois revisores num sistema duplo-cego para avaliação e emissão de um relatório fundamentado (*peer review*), que será usado pelos Editores para decidir se o manuscrito será aceito ou não. O manuscrito também é enviado para Revisores de Métodos Quantitativos para análise. No caso

- de conflito de pareceres dos revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro parecerista para validar uma decisão final.
5. Comentários dos Revisores (*Free Form Review*) serão encaminhados ao autor correspondente (autor principal para correspondência editorial) para responder aos questionamentos feitos.
 6. Os autores enviam suas respostas aos questionamentos e reenviam a versão revisada do manuscrito. A versão revisada será enviada aos revisores que emitirão um relatório final fundamentado.
 7. Os apontamentos dos Revisores e as respostas dos autores serão analisados pelo Editor-Chefe, Editores Associados ou Editores de Seção.
 8. O Editor-Chefe emite uma decisão final.
 9. A decisão editorial final (aceitação ou rejeição) é enviada aos autores.
 10. Após esta etapa, inicia-se o processo de edição. O manuscrito aceito é enviado à edição quanto à qualidade linguística do inglês.
 11. A revisão de inglês é enviada aos autores para análise e declaração de aceitação da revisão.
 12. Após esta etapa, inicia-se o processo de diagramação, com contato com o autor correspondente no que diz respeito às figuras, tabelas, fotografias, mapas, ilustrações e formatação em geral.
 13. Após esta etapa, é requerido aos autores declarar formalmente qualquer conflito de interesse, suporte financeiro e cessão de direitos autorais.
 14. Provas são enviadas ao autor correspondente para cuidadosa correção e acuidade tipográfica.

15. A versão final de cada manuscrito é selecionada para compor o próximo número e será enviada ao *Ahead of Print* na plataforma SciELO.
16. A versão impressa é publicada a cada dois meses e será disponibilizada em acesso aberto em <http://www.scielo.br/rsbmt>.