

Ação *In Vitro* do Cloridrato de Ciprofloxacino, Naproxeno, e Ácido Fólico sobre o *Trypanosoma cruzi*, Usando o Benzonidazol como Padrão-ouro

Evaluation the In Vitro Action of Ciprofloxacin Hydrochloride, Naproxen, and Folic Acid on Trypanosoma cruzi, Using Benznidazole as a Gold Standard

Cristiane Castro Faccini,¹ Angela Maria Lourenço,¹ Abilio Augusto Fragata Filho¹

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Laboratório de Doença de Chagas Elias Boainain,¹ São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: O benzonidazol é a única droga contra o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) disponível no Brasil. No entanto, ele tem eficácia limitada e efeitos colaterais frequentes. Estudos recentes sugerem que o cloridrato de ciprofloxacino, o naproxeno, e o ácido fólico possam ter efeitos benéficos no tratamento da doença de Chagas.

Objetivo: Avaliar a ação parasiticida *in vitro* do ciprofloxacino, do naproxeno, e do ácido fólico na cepa Y do *T. cruzi*, usando o benzonidazol como padrão-ouro.

Métodos: Comprimidos de benzonidazol, ciprofloxacino, naproxeno, e ácido fólico foram macerados, pesados, e adicionados a tubos de ensaio com um meio de cultura contendo 100 000 formas por mL e tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Amostras de cada tubo foram analisadas e contadas com um hemocitômetro em um microscópio ótico por quatro dias após a adição da droga. Assim, a dose mínima efetiva de cada droga foi determinada.

Resultados: Em comparação ao benzonidazol, concentrações mais altas de ciprofloxacino e de naproxeno foram efetivas como parasiticidas *in vitro*. Por outro lado, o ácido fólico não apresentou ação parasiticida *in vitro*. Assim, as observações prévias de sua efetividade provavelmente relacionam-se à sua ação indireta.

Conclusão: Em nosso experimento, a ciprofloxacina e o naproxeno apresentaram efeito tripanosomicida *in vitro*, mas o ácido fólico não apresentou esse efeito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Técnicas *In Vitro*; Ácido Fólico; Naproxeno.

Abstract

Background: Benznidazole is the only drug against *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) available in Brazil. However, it has limited efficacy and frequent side effects. Recent studies suggest that ciprofloxacin hydrochloride, naproxen, and folic acid may have beneficial effects in treating the Chagas disease.

Objective: To assess the *in vitro* parasitocidal action of ciprofloxacin, naproxen, and folic acid on the Y strain of *T. cruzi*, using benznidazole as a gold standard.

Methods: Tablets of benznidazole, ciprofloxacin hydrochloride, naproxen, and folic acid were macerated, weighed, and added to test tubes with a culture medium containing 100,000 forms per ml of *T. cruzi* trypomastigotes (strain Y). Samples from each tube were analyzed and counted in a Neubauer hemocytometer under an optical microscope for four days after adding the drugs. Thus, the minimum effective dose of each drug was determined.

Results: As compared with benznidazole, higher concentrations of ciprofloxacin and naproxen were effective as *in vitro* parasiticides. In contrast, folic acid showed no direct *in vitro* parasitocidal action. Hence, previous observations reporting its effectiveness are probably due to indirect action.

Conclusion: In our experiment, ciprofloxacin and naproxen showed a trypanosomicidal effect *in vitro*, but folic acid did not show this effect.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; *In Vitro* Techniques; Folic Acid; Naproxen.

Full texts in English - <https://www.abcheartfailure.org/>

Correspondência: Cristiane Castro Faccini •

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Laboratório de Doença de Chagas – Av. Dr. Dante Pazzanese, 500. CEP 04012-909, Prédio 1, São Paulo, SP – Brasil
E-mail: cristiane.faccini@dantepazzanese.org.br

Artigo recebido em 09/10/2023, revisado em 28/02/2024, aceito em 06/03/2024

DOI: <https://doi.org/10.36660/abchf.20230077>

Figura Central: Ação *In Vitro* do Cloridrato de Ciprofloxacino, Naproxeno, e Ácido Fólico sobre o *Trypanosoma cruzi*, Usando o Benzonidazol como Padrão-ouro

ABC Heart Failure & Cardiomyopathy



ABC Heart Fail Cardiomyop. 2023; 3(4):e20230077

Introdução

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909. A doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um parasita flagelado unicelular. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que existam cerca de seis a sete milhões de pessoas contaminadas e 70 milhões de pessoas em risco de serem infectadas.

A transmissão da doença pode ser vetorial, por transfusão de sangue e de derivados, por transplante de órgãos, transplacentária, por via oral, entre outros mecanismos. Atualmente, a transmissão oral relacionada à ingestão de suco de açaí é a mais crítica desses mecanismos no Brasil, predominantemente na região norte do país.²

A doença de Chagas tem duas fases: aguda e crônica. A fase aguda sucede a infecção, e geralmente não é muito expressiva do ponto de vista clínico, com elevada parasitemia e inflamação. Essa fase dura cerca de oito a 10 semanas e em seguida, a parasitemia e a inflamação diminuem substancialmente. A fase crônica inicia-se nesse ponto, durando um período variável que pode se estender por toda a vida, somente com sorologia positiva e sem manifestações clínicas (forma indeterminada). Cerca de 30 a 50% dos pacientes desenvolvem sinais clínicos 10 ou 20 anos após a infecção, apresentando manifestações

cardíacas, digestivas ou mistas, com aumento na morbidade e mortalidade.³

Existem dois medicamentos com efeitos parasiticidas sobre o *T. cruzi* que têm sido utilizados por mais de 40 anos: o nifurtimox e o benzonidazol. No entanto, essas drogas têm baixa eficácia quando administradas na fase crônica (tardia) da doença.⁴ Outros agentes farmacológicos foram testados, por exemplo, a amiodarona. Esse agente apresentou uma ação parasiticida contra os tripomastigotas do *T. cruzi*, requerendo avaliações *in vivo*.⁵

Outros componentes testados incluem o ciprofloxacino, o naproxeno, e o ácido fólico. O ciprofloxacino, um antibiótico de amplo espectro pertencente ao grupo das quinolonas, foi testado como um parasiticida por inibir a enzima trans-sialidase, que é vital para o *T. cruzi*.^{6,7} Por outro lado, o naproxeno é uma droga anti-inflamatória, antipirética e analgésica derivada do ácido propiônico. Essa droga inibe as isoformas I e II da ciclooxigenase, relacionadas com a síntese de prostaglandina, prostaciclina, e tromboxano a partir do ácido araquidônico. O naproxeno também foi testado contra o *Trypanosoma*, dada sua ação inibitória sobre a síntese da enzima farnesil pirofosfato, levando a alterações celulares no parasita.^{8,9} O ácido fólico é uma forma sintética do folato usado como um suplemento dietético uma vez que ele não é produzido no corpo humano. A deficiência de ácido está relacionada a várias doenças, tais como câncer, doença de Alzheimer, e anemia megaloblástica. Embora sua

atividade *in vivo* contra o *T. cruzi* tenha sido demonstrada, seu mecanismo de ação permanece pouco clara, com incertezas sobre se o efeito antiparasitário do ácido fólico é direto ou por estímulo do sistema imune.¹⁰

Adasme et al.¹¹ mostraram a ação parasiticida do ciprofloxacino, do naproxeno, e do ácido fólico nas cepas mexicanas NINOA e INC-5 do *T. cruzi* usando um modelo murino. Dada a necessidade de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas, esses dados encorajadores requerem mais estudos para confirmar os resultados, já que seus níveis foram abaixo do esperado.^{11,12} Portanto, nosso estudo tem como objetivo avaliar a ação parasiticida *in vitro* do ciprofloxacino, do naproxeno, e do ácido fólico sobre a cepa Y do *T. cruzi*.

Métodos

Parasitas

Tripomastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) usados neste estudo derivaram da cultura *in vivo* mantida no laboratório por passagens sucessivas em camundongos das linhagens A/Snell, cada um pesando em média 23 gramas. A cultura do parasita é parte da rotina do Laboratório de Doença de Chagas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Utilizamos o concentrado de hemácias obtido das amostras de sangue coletadas dos camundongos no sétimo dia após a infecção, o que corresponde ao pico de parasitemia; esse material é geralmente descartado. Esse foi um procedimento totalmente estéril, realizado em uma cabine de fluxo laminar, seguindo os procedimentos operacionais padrões do laboratório.

Proliferação *in vitro*

As formas tripomastigotas do parasita foram cultivadas em três tubos de ensaio contendo 5mL do meio de cultura LIT (*liver infusion triptose*), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativo.¹³ Cada tubo recebeu 1mL do concentrado de hemácias infectadas e colocado em uma câmara de germinação a 28°C. Dez dias depois, preparados frescos em lâminas e lamínulas de 22x22mm foram feitos, e examinados com microscópio óptico seguindo-se o método de cultura de sangue de Chiari et al.¹⁴ Em uma cabine de fluxo laminar, 1 mL de cultura foi coletada em cada um dos dez dias e transferido para tubos contendo 5mL de meio LIT. Esses tubos foram mantidos na câmara de germinação a 28°C por quatro dias. O material foi então colocado entre as lâminas e lamínulas e examinado conforme descrito anteriormente. Os parasitas nas amostras foram contados usando um hemocítmetro Neubauer para determinar o crescimento, e os tubos que continham 100 000 formas por mL foram separados para serem testados quanto à atividade parasiticida dos compostos avaliados.¹⁵ Para o experimento sobre efeitos dos medicamentos, o benzonidazol foi usado como padrão ouro para o cloridrato de ciprofloxacino, naproxeno e ácido fólico.

Os comprimidos de cada medicamento foram individualmente macerados, pesados em uma balança de precisão, e homogeneizados com 1mL de meio LIT. Em seguida, os tubos de ensaio contendo 5mL de solução com parasitas receberam os compostos testados em três concentrações (10, 20, e 100mg) – exceto o ácido fólico (uma dose de 5mg) (Tabela 1).

A escolha das doses foi baseada nas apresentações comerciais cujo uso já é amplamente avaliado.

Depois que os experimentos foram concluídos, a dose efetiva mínima de cada droga adicionada à cultura foi determinada. Esse procedimento foi realizado duas vezes para cada dose de medicamento. Dois tubos controles sem adição da medicação foram usados para comparação de todos os procedimentos. Ao final do quarto dia de exposição às drogas testadas, o material de cada tubo foi analisado e contado com um hemocítmetro Neubauer em um microscópio ótico.

Resultados

A Tabela 2 apresenta o peso de cada medicamento adicionado à cada tubo de ensaio e a concentração final da droga na solução de 6mL (meio de cultura com parasitas e medicamento). A tabela descreve ainda o número absoluto de parasitas em cada tubo no primeiro, segundo, terceiro e quarto dias de tratamento, bem como a porcentagem de parasitas em cada recipiente no quarto dia em relação ao primeiro dia. Esses dados representam os valores médios após dois experimentos com cada composto e controle testado (Figura Central).

Grupo Controle

O número de parasitas no grupo controle aumentou em 217,5% no quarto dia de tratamento.

Ácido fólico

Observou-se um aumento de 316% de parasitas no quarto dia de tratamento com ácido fólico na concentração de 0,83mg/mL, um resultado similar ao observado no grupo controle (Figura 1).

Ciprofloxacino

O tratamento com 100mg de ciprofloxacino (16,66mg/mL) diminuiu o número de parasitas para 9,09% no quarto dia. Embora menos marcante que o tratamento com 100mg, a redução na concentração foi ainda evidente aplicando-se 20 mg (3,33mg/mL) e 10 mg (1,66mg/mL) de ciprofloxacino, com 28,8% e 23,3% de parasitas remanescentes em relação ao primeiro dia, respectivamente (Figura 2).

Tabela 1 – Delineamento experimental para o teste de diferentes doses de medicamentos na cultura de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (tubos de 5mL)

Drogas testadas	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Benzonidazol	100mg	20mg	10mg
Cloridrato de ciprofloxacino	100mg	20mg	10mg
Naproxeno	100mg	20mg	10mg
Ácido fólico	5mg		

Tabela 2 – Número absoluto de parasitas por tratamento em cada tubo no primeiro, segundo, terceiro e quarto dias de tratamento e a porcentagem em cada tubo no quarto dia

	Controle	Ácido fólico	Cloridrato de Cipro.	Cloridrato de Cipro	Cloridrato de Cipro	Naproxeno	Naproxeno	Naproxeno	Naproxeno	BenZ	BenZ	BenZ	BenZ
		5mg	100mg	20mg	10mg	100mg	50 mg	20mg	10mg	100mg	50 mg	20mg	10mg
1º dia	188,5	200	66	125	189	46,5	34	85,5	288	164	56,5	180	298,5
2º dia	282,5	610	23,5	100	120	107	29	77	417,5	125	7	134,5	189
3º dia	335	611	10,5	56,5	40,5	0	12	81	157	11,5	3,5	32	51,5
4º dia	410	632	6	36	44	0	7,5	60	103	0	0,5	2	4,5
Porcentagem de parasitas remanescentes no 4º dia	217,50%	316	9,09%	28,80%	23:28	0%	22,05%	70,17%	35,76%	0%	0,88%	1,11%	1,50%
Concentração por tubo (mg/mL)		0,83	16,66	3,33	1,66	16,66	8,33	3,33	1,66	16,66	8,33	3,33	1,66

*6 mL do volume total em cada tubo de cultura – dois experimentos por amostra. Cipro.: ciprofloxacino; BenZ: benzonidazol.

Naproxeno

A cultura foi negativa para parasitas com 100mg de naproxeno (16,66mg/mL) no quarto dia de tratamento. Embora de modo menos significativo que com o tratamento com 100mg, as concentrações dos parasitas também diminuíram com os demais tratamentos – 22,05% com 50mg (8,33mg/mL); 70,17% com 20mg (3,33mg/mL); 35,76% com 10mg (1,66mg/mL) (Figura 3).

Benzonidazol

Este composto representou o padrão ouro para a atividade parasiticida no estudo, ao resultar em uma cultura negativa para parasitas com o tratamento com 100mg (16,66mg/mL). Além disso, o número de parasitas diminuiu para 0,88% com tratamento com 50mg (8,33mg/mL), 1,11% com 20mg (3,33mg/mL), e 1,5% com 10mg (1,66mg/mL) (Figura 4).

Discussão

Atualmente, o benzonidazol e o nifurtimox são as únicas drogas com ação parasiticida comprovada, utilizadas para tratar doença de Chagas, apesar de seus efeitos colaterais não desprezíveis. Apesar de sua eficácia ser reconhecida na fase aguda da doença em crianças, seus efeitos na fase crônica tardia continuam discutíveis.

A busca por novos compostos que possam atuar sobre o *T. cruzi* levou os pesquisadores a estudar compostos com ação potencial sobre o metabolismo do parasita e sua consequente destruição. Ainda, recentemente, demonstrou-se que a atividade parasiticida *in vitro* da amiodarona foi similar à do benzonidazol.¹⁶ Todos esses estudos investigaram os efeitos parasiticidas de medicamentos regularmente utilizados em várias situações clínicas, com base em suas propriedades farmacológicas. Portanto, esses três compostos atraíram atenção – ciprofloxacino, ácido fólico e naproxeno¹⁷ – e assim desenvolvemos o presente estudo *in vitro* baseado nesses achados.

O ciprofloxacino é um antibiótico sintético de amplo espectro da classe das fluoroquinolonas; ele tem potencial ação parasiticida por inibir a trans-sialidase.¹⁸ Mostramos uma importante ação parasiticida do ciprofloxacino a 16,66mg/mL (tratamento com 100 mg). Somente 9,09% dos parasitas permaneceram vivos nessa concentração no quarto dia de crescimento da cultura. Ao usar somente 20 mg (3,33mg/mL) e 10 mg (1,66 mg/mL) desse antibiótico, a redução do parasita na cultura foi menos pronunciado, mas importante, com 28,8% e 23,3% de parasitas sobreviventes, respectivamente. Esses resultados *in vitro* são encorajadores, uma vez que o ciprofloxacino tem sido usado por muito tempo contra várias condições infecciosas, com manuseio seguro e bem conhecido.

O naproxeno é um derivado do ácido propiônico, com propriedades analgésica, antipirética, e anti-inflamatória, classificado como um composto anti-inflamatório não hormonal. Sua ação baseia-se na inibição da ciclooxigenase (Cox I e II), que interfere na síntese de prostaglandinas, prostaciclina, e tromboxano, a partir do ácido araquidônico.¹⁹

O naproxeno, na dose de 100mg *in vitro* (16,66mg/mL) eliminou totalmente os parasitas da cultura. No entanto, essa ação foi bem menos expressiva a 50 mg (8,33mg/mL), 20mg (3,33 mg/mL), e 10mg (1,66 mg/mL), resultando em concentrações de parasitas de 22,05%, 70,17%, e 35,76%, respectivamente. O naproxeno tem sido usado na prática clínica por muitos anos, com mecanismos de ações e contraindicações bem estabelecidos.

O ácido fólico tem sido usado como um suplemento dietético por um longo tempo, principalmente em pacientes com vários tipos de anemia. A deficiência de folato está relacionada com várias doenças, tais como alguns tipos de cânceres, doença de Alzheimer, hipertensão, e algumas complicações materno-fetais.¹⁷ Sabe-se, também, que a imunidade celular está significativamente comprometida na deficiência de folato.²⁰

No presente estudo, o ácido fólico não inibiu o crescimento de parasitas na dose de 5mg (0,83mg/mL), resultando em

Artigo Original

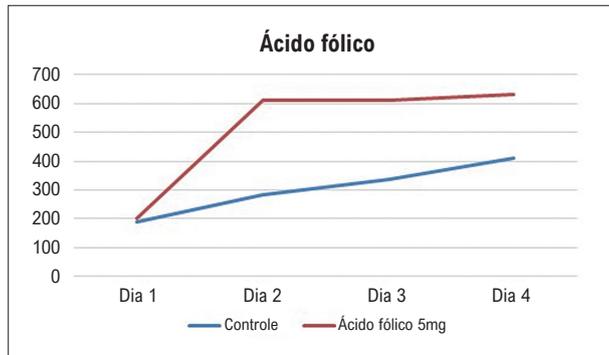


Figura 1 – Variação na contagem de células em cultura *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com 5 mg de ácido fólico.

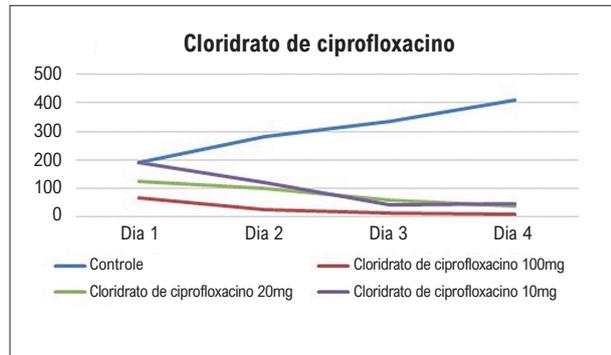


Figura 2 – Variação na contagem de células de cultura *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com 10 mg, 20 mg e 100 mg de cloridrato de ciprofloxacino, juntamente com contagens de cultura de controle.

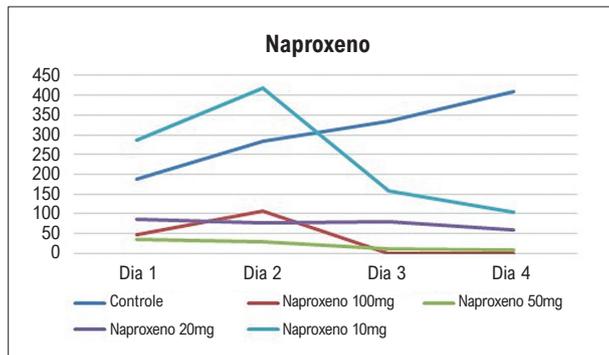


Figura 3 – Variação na contagem de células de cultura *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com 10 mg, 20 mg, 50 mg e 100 mg de naproxeno, juntamente com contagens de cultura de controle.

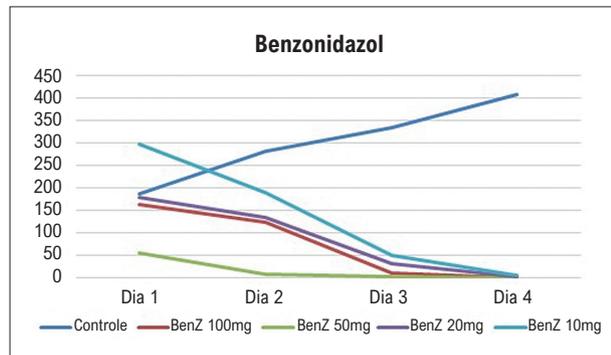


Figura 4 – Variação na contagem de células de cultura *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com 10 mg, 20 mg, 50 mg e 100 mg de benzonidazol, juntamente com contagens de cultura de controle.

um aumento de 316% na cultura de *T. cruzi* em relação ao número inicial de parasitas.

O benzonidazol foi usado como um padrão-ouro devido à sua inquestionável atividade parasiticida, como observado para as doses de 100mg (16,6 mg/mL; 0%), 50mg (8,33 mg/mL; 0,88%), 20mg (3,33 mg/mL; 1,11%) e 10mg (1,66 mg/mL; 1,5%).

O ciprofloxacino e o naproxeno também foram efetivos como parasiticidas *in vitro* em concentrações mais altas em comparação ao padrão-ouro. Por outro lado, o ácido fólico não apresentou ação parasiticida direta *in vitro*. Assim, observações prévias sobre sua eficácia devem-se provavelmente à sua ação indireta melhorando o perfil imune.^{17,20}

Conclusão

O uso de cloridrato de ciprofloxacino, naproxeno e ácido fólico está bem estabelecido e controlado. Portanto, estudos *in vivo*, incluindo humanos, são necessários para determinar se o efeito parasiticida dessas drogas no ciclo de vida do parasita é direto ou indireto. Isso poderia trazer novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas.

Em nosso experimento, a ciprofloxacina e o naproxeno apresentaram efeito tripanosomicida *in vitro*, mas o ácido fólico não apresentou esse efeito.

Limitações do estudo

Nosso estudo avaliou a capacidade dessas drogas em eliminar e prevenir a proliferação somente da cepa Y do *T. cruzi* e somente em meio de cultura *in vitro*.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo: Faccini CC, Lourenço AM, Fragata Filho AA; Análise estatística: Fragata Filho AA; Redação do manuscrito: Faccini CC.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo.

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia sob o número de protocolo

026/2022. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013.

Referências

1. World Health Organization. Chagas Disease in Latin America: An Epidemiological Update Based on 2010 Estimates [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2023 Oct 24]. Available from: <https://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>.
2. Pinto AY, Valente SA, Valente VC. Emerging Acute Chagas Disease in Amazonian Brazil: Case Reports with Serious Cardiac Involvement. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(6):454-60. doi: 10.1590/s1413-86702004000600010.
3. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
4. Fragata-Filho AA, França FF, Fragata CS, Lourenço AM, Faccini CC, Costa CA. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazol in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004508. doi: 10.1371/journal.pntd.0004508.
5. Lourenço AM, Faccini CC, Costa CAJ, Mendes GB, Fragata AA Filho. Evaluation of in Vitro Anti-Trypanosoma Cruzi Activity of Medications Benznidazole, Amiodarone Hydrochloride, and their Combination. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(1):52-6. doi: 10.1590/0037-8682-0285-2017.
6. Nenortas E, Burri C, Shapiro TA. Antitrypanosomal Activity of Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(8):2066-8. doi: 10.1128/AAC.43.8.2066.
7. Cavalcanti DP, Fragoso SP, Goldenberg S, Souza W, Motta MC. The Effect of Topoisomerase II Inhibitors on the Kinetoplast Ultrastructure. *Parasitol Res*. 2004;94(6):439-48. doi: 10.1007/s00436-004-1223-4.
8. Angiolillo DJ, Weisman SM. Clinical Pharmacology and Cardiovascular Safety of Naproxen. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2017;17(2):97-107. doi: 10.1007/s40256-016-0200-5.
9. Huang CH, Gabelli SB, Oldfield E, Amzel LM. Binding of Nitrogen-Containing Bisphosphonates (N-BPs) to the Trypanosoma Cruzi Farnesyl Diphosphate Synthase Homodimer. *Proteins*. 2010;78(4):888-99. doi: 10.1002/prot.22614.
10. Zheng Y, Cantley LC. Toward a Better Understanding of Folate Metabolism in Health and Disease. *J Exp Med*. 2019;216(2):253-66. doi: 10.1084/jem.20181965.
11. Adasme MF, Bolz SN, Adelman L, Salentin S, Haupt VJ, Moreno-Rodríguez A, et al. Repositioned Drugs for Chagas Disease Unveiled via Structure-Based Drug Repositioning. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8809. doi: 10.3390/ijms21228809.
12. Levy AMA. Padronização e Avaliação do Teste de Imunofluorescência com Tripomastigotas Fixados in situ na Detecção de Anticorpos Indicadores da Persistência da Infecção em Chagásicos Crônicos [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1991.
13. Camargo EP. Growth and Differentiation in Trypanosoma Cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1964;6:93-100.
14. Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the Parasitological Diagnosis of Human Chronic Chagas' Disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1989;22(1):19-23. doi: 10.1590/s0037-86821989000100004.
15. Dias JCP, Coura JR. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997.
16. Lourenço AM, Faccini CC, Costa CAJ, Mendes GB, Fragata Filho AA. Evaluation of in Vitro Anti-Trypanosoma Cruzi Activity of Medications Benznidazole, Amiodarone Hydrochloride, and their Combination. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(1):52-6. doi: 10.1590/0037-8682-0285-2017.
17. Adasme MF, Bolz SN, Adelman L, Salentin S, Haupt VJ, Moreno-Rodríguez A, et al. Repositioned Drugs for Chagas Disease Unveiled via Structure-Based Drug Repositioning. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8809. doi: 10.3390/ijms21228809.
18. Nardy AF, Freire-de-Lima CG, Pérez AR, Morrot A. Role of Trypanosoma Cruzi Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Front Microbiol*. 2016;7:348. doi: 10.3389/fmicb.2016.00348.
19. Angiolillo DJ, Weisman SM. Clinical Pharmacology and Cardiovascular Safety of Naproxen. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2017;17(2):97-107. doi: 10.1007/s40256-016-0200-5.
20. Dhur A, Galan P, Hercberg S. Folate Status and the Immune System. *Prog Food Nutr Sci*. 1991;15(1-2):43-60.

