

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas de  
*Trypanosoma cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano para  
avaliação de substâncias potencialmente ativas contra a doença de  
Chagas**

**por**

**Mariana Eduarda A. S. A. Lopes**

**Belo Horizonte**

**2016**

**DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR M.E.A.S.A LOPES 2016**

**Mariana Eduarda A. S. A. Lopes**

**Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas  
de *Trypanosoma cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano  
para avaliação de substâncias potencialmente ativas contra a doença  
de Chagas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta e Dra. Elaine Maria de Souza-Fagunde.

Co-orientação: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho.

**Belo Horizonte**

**2016**

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da Fiocruz

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

L864e  
2016

Lopes, Mariana Eduarda A. S. A.

Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano para avaliação de substâncias potencialmente ativas contra a doença de Chagas / Mariana Eduarda A. S. A. Lopes. – Belo Horizonte, 2016.

XVI, 51 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 62 - 67

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Doença de Chagas/quimioterapia 2. *Trypanosoma cruzi*/crescimento & desenvolvimento 3. Citometria de Fluxo/utilização.  
I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação). III. Fagundes, Elaine Maria de Souza (Orientação). IV. Carvalho, Andréa Teixeira de (Coorientação).

cdd – 22. ed. – 616.936 3

**Mariana Eduarda A.S.A Lopes**

**Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano para avaliação de substâncias potencialmente ativas contra a doença de Chagas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

**Banca examinadora:**

Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes (UFMG) Presidente

Prof.Dra. Vanessa Peruype Magalhães Pascoal (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof.Dr. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (UFMG) Titular

Prof.Dr. Policarpo Ademar Sales Junior (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/02/2016**

---

---

*“Para nós os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, mas aqueles que os descobriram”. (Albert Schweitzer)*

---

*Dedico este trabalho a minha família, que é minha base,  
força e inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que guia todos os meus passos e está sempre presente na minha vida!

À minha família, mãe, pai, irmão e familiares por todo o amor, confiança, base, por me conduzir sempre no caminho do bem, pelo grande incentivo que me levou a mais essa conquista e por me ensinar que juntos, somos muito mais fortes!

Agradeço as minhas orientadoras Elaine Maria de Souza Fagundes e Silvane Maria Fonseca Murta e minha co-orientadora Andréa Teixeira de Carvalho, pela oportunidade, confiança ao desenvolver este trabalho, pela enorme contribuição científica e pessoal a minha formação, muito obrigada.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, por me proporcionarem um excelente ambiente de trabalho e crescimento científico.

Aos meus colegas do Centro de Pesquisas René Rachou, em especial os meus amigos do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular- FIOCRUZ, pelo apoio, amizade, incentivo e pela boa gargalhada de sempre.

Agradeço a Graziela Dantas e Bethânia Vaz pela grande ajuda e dedicação pelo meu trabalho, muito obrigada por tudo.

Ao Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração - FIOCRUZ, agradeço aos apoios técnicos pelo fornecimento das soluções utilizadas no meu mestrado, e também pelo conhecimento que me passaram, em especial ao Matheus Fernandes por ter me acompanhado e ensinado no início do projeto.

Agradeço as meninas da plataforma de Citometria de fluxo do Centro de Pesquisas René Rachou, pela ajuda e paciência.

Aos meus queridos amigos de infância, de colégio e faculdade, muito obrigada pela torcida e por estarem sempre ao meu lado!! Em especial a melhor amiga Lorena Dias por ser umas das maiores incentivadoras, junto com meu pai e minha mãe!

A minha querida amiga Joyce Fernanda, que não está mais entre nós, também dedico esse trabalho a ela!

Muito obrigada CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, FAPEMIG-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (projetos aprovados no Edital FAPEMIG 07/2009 - Programa de Apoio a Grupos Emergentes de Pesquisa, Projeto Pesquisador Mineiro 2013 e Fundação Oswaldo Cruz pelo suporte financeiro.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas é de grande importância devido à alta toxicidade e baixa eficácia de cura na fase crônica das drogas utilizadas para o tratamento clínico dessa doença. Outras abordagens quimioterapêuticas para o tratamento da doença de Chagas estão sendo pesquisadas e requerem ensaios de triagem apropriados para avaliação de sua efetividade. Assim, este estudo tem como objetivo padronizar ensaio funcional preditivo utilizando a internalização de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano e análise simultânea de citotoxicidade por citometria de fluxo. Essa abordagem permitirá a avaliação do potencial anti-*T. cruzi* e imunotóxico de novos compostos e produtos naturais, com vistas ao estabelecimento de metodologias preditivas úteis para a descoberta de novos fármacos para tratamento da doença de Chagas. A proposta desta metodologia é ser utilizada como ensaio preditivo/confirmatório (para uma triagem secundária após identificação de compostos bioativos em ensaios convencionais), de compostos em potencial para seguirem no fluxograma de desenvolvimento de um novo quimioterápico para doença de Chagas. Neste estudo, foi utilizado o sangue periférico de 15 voluntários saudáveis que foi incubado por 6 horas na presença/ausência de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com fluoresceína, na ausência/presença dos fármacos tripanomicidas, como benzonidazol 100 µM, ravuconazol 10 µM e posaconazol 100 µM. O sobrenadante das culturas foi utilizado para quantificar citocinas (IL-1-β, IL-6 TNF e IL-10) e quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL8). Os dados obtidos demonstraram que houve redução da capacidade de internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* na presença de ravuconazol, demonstrando sua potencial atividade anti-*T. cruzi*. Além disso, a avaliação do perfil imunomodulador das drogas testadas revelou um perfil pró-inflamatório modulado, em que as citocinas IL-10 e TNF apresentaram maior expressão após a adição dos fármacos, destacando-se uma maior produção de IL-10 na presença de benzonidazol, ravuconazol e posaconazol que por sua vez está associada de forma inversa com a produção de TNF, nessas mesmas condições. A adição de ravuconazol e posaconazol nas culturas induz ainda uma diminuição de CCL2 e aumento de CCL5 em comparação ao perfil apresentado na ausência de fármacos e na presença de benzonidazol. Em suma, o ensaio preditivo inovador proposto pelo estudo pode ser futuramente uma ferramenta útil como um ensaio confirmatório para seleção de compostos mais promissores, identificados em programas de prospecção de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, quimioterapia, sangue periférico humano, 7-AAD, citometria de fluxo, tripanossomicida, citocinas, quimiocinas, citotoxicidade.

## ABSTRACT

The discovery and development of new drugs for Chagas disease treatment is urgent due to the high toxicity and low cure efficacy in chronic phase of drugs used for clinical treatment of this disease. Other chemotherapeutic approaches for Chagas disease treatment are being researched and require screening assays suitable for evaluating effectivity. This study aims to standardize predictive functional assay using the internalization of epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* by human peripheral blood leukocytes and simultaneous analysis of cytotoxicity by flow cytometry. This approach allows the evaluation of potential anti-*T. cruzi* and immunotoxicity of new compounds and natural products to establish predictive methodologies useful for the discovery of new drugs for Chagas disease treatment. The purpose of this methodology is to be utilized as a predictive/confirmatory assay (for a secondary screening after identification of bioactive compounds by conventional assays) of potential compounds to follow in the platform of development of new chemotherapeutic agents against Chagas disease. In this study, peripheral blood samples of 15 healthy volunteers were incubated for 6 hours in the presence/absence of *T. cruzi* epimastigote forms labeled with fluorescein in the absence/presence of anti-*T. cruzi* drugs: 100 uM benznidazole, 10 uM ravuconazole and 100 uM posaconazole. The culture supernatant was used to measure cytokines (IL-1- $\beta$ , IL-6, TNF and IL-10) and chemokines (CCL2, CCL5 and CXCL8). The data showed a reduction in the internalization of *T. cruzi* epimastigote forms exposed to ravuconazole, demonstrating its potential anti-*T. cruzi* activity. In addition, the evaluation of immunomodulatory profile of drugs tested here revealed a pro-inflammatory profile modulated. IL-10 and TNF cytokines showed highest expression upon addition of the drug, especially IL-10, in the presence of benznidazole, ravuconazole and posaconazole which is inversely related to production of TNF under these same conditions. The addition of posaconazole and ravuconazole to cultures induced a decrease of CCL2 and increase of CCL5 compared to profile of cells without drug and in the presence of benznidazole. In conclusion, the innovative predictive test proposed in this study may be a useful tool as a confirmatory test for selection of compounds more promising, identified in prospecting programs of new drugs for Chagas disease treatment.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, chemotherapy, human peripheral blood, 7-AAD, flow cytometry, trypanocidal, cytokines, chemokines, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i> .....	<b>18</b>
<b>FIGURA 2:</b> Evolução do número de publicações científicas sobre doença de Chagas nos últimos anos.....	<b>25</b>
<b>FIGURA 3:</b> Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	<b>26</b>
<b>FIGURA 4:</b> Gráficos de densidade representativos da análise da internalização de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano.....	<b>37</b>
<b>FIGURA 5:</b> Seleção e marcação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	<b>40</b>
<b>FIGURA 6:</b> Perfil representativo do efeito do benzonidazol na internalização de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano de um voluntário saudável.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 7:</b> Perfil representativo do efeito do ravuconazol na internalização de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano de um voluntário saudável.....	<b>46</b>
<b>FIGURA 8:</b> Perfil representativo do efeito do posaconazol na internalização de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano de um voluntário saudável.....	<b>47</b>
<b>FIGURA 9:</b> Avaliação da internalização de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano dos voluntários.....	<b>49</b>
<b>FIGURA 10:</b> Perfil de citocinas no sobrenadante de culturas de curta duração de sangue total.....	<b>51</b>
<b>FIGURA 11:</b> Perfil de quimiocinas no sobrenadante de culturas de curta duração de sangue total.....	<b>52</b>
<b>FIGURA 12:</b> Perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas em culturas de curta duração de sangue total.....	<b>53</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Perfil hematológico dos voluntários saudáveis que participaram do projeto e valores de referência para série branca do hemograma.....	<b>41</b>
<b>TABELA 2:</b> Perfil de internalização de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade celular por monócitos do sangue periférico dos voluntários saudáveis participantes do estudo, analisados em ensaios de citometria de fluxo.....	<b>43</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7 AAD - 7-Aminoactinomicina D (do inglês, *7-Aminoactinomycin D*).

B.O.D - Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês, *biochemical oxygen demand*).

Bz - Benzonidazol (do inglês, *benznidazole*).

BSA - Albumina bovina sérica (do inglês, *bovine serum albumin*).

CBA - Ensaio citofluorimétrico com microesferas fluorescentes (do inglês, *cytometric bead array*).

CD - Grupamento de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*).

CD14 - Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo. Presente em células mielomonocíticas.

CCL2/MCP-1 - Ligante 2 do motivo C-C/Proteína quimioatraente de monócitos 1 (do inglês, *C-C motif ligand 5/monocyte chemoattractant protein-1*).

CCL5/RANTES - Ligante 5 do motivo C-C/Fator regulado e secretado após ativação de células T (do inglês, *C-C motif ligand 5/regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted*).

CCL9/MIG – Ligante 9 do motivo C-C/monocina induzida por interferon gama (do ingles, chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) is a small cytokine belonging to the CXC chemokine family that is also known as Monokine induced by gamma interferon (MIG).

CCL10/IP-10 – Ligante 10 do motivo C-C/protein de 10 kDa induzida por interferon gama (do ingles, C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) also known as Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) or small-inducible cytokine B10.

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono.

CXCL8/IL-8 - Ligante 8 do motivo C-X-C/Interleucina 8 (do inglês, *C-C motif ligand 8/Interleukin 8*).

DMSO - Dimetilssulfóxido.

FITC - Isotiocianato de fluoresceína.

FL1 - Fluorescência tipo 1.

FL2 - Fluorescência tipo 2.

FL3 - Fluorescência tipo 3.

IC50 - Concentração inibitória para 50% da viabilidade celular.

IL - Interleucina.

IMF - Intensidade Média de Fluorescência.

MFF - Macs Facs Fix, solução fixadora contendo paraformaldeído como agente fixador.

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

NNN/LIT - Neal, Novy, Nicolle (Meio de cultivo bifásico) para cultura de tripanossomatídeos.

°C - Graus Celcius.

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico humano (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*)

PBS - Tampão fosfato salínico (do inglês, *phosphate buffered saline*).

PBS-WASH - Tampão fosfato salínico contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica.

PE – Ficoeritrina (do inglês, *phycoerythrin*).

POS - Posaconazol (do inglês, *posaconazole*).

RAV - Ravuconazol (do inglês, *ravuconazole*).

RPMI - Meio de cultivo celular (do inglês, *Roswell park memorial institute*).

SFB - Soro fetal bovino.

TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumoral necrosis factor*).

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doença de Chagas.....	17
1.2 Resposta imune na doença de Chagas.....	18
1.3 Quimioterapia.....	20
1.4 Importância de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.....	23
1.5 O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.....	24
1.5.1 Prospecção de moléculas potencialmente antiparasitárias por meio dos ensaios biológicos convencionais.....	26
1.6 Ensaios para avaliação de toxicidade e potencial imunomodulador <i>in vitro</i> utilizando sangue total.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Amostras de Sangue Periférico Humano.....	32
4.2 Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas de <i>T.cruzi</i> .....	32
4.2.1 Cultivo e marcação das formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> com FITC.....	32
4.2.2 Internalização de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> por leucócitos do sangue periférico humano.....	33
4.3 Análise da viabilidade celular.....	34
4.4 Efeito do benzonidazol, ravuconazol e posaconazol na internalização de formas epimastigotas de <i>T.cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano e na viabilidade celular.....	35
4.4.1 Fármacos controle/referência.....	35
4.5 Preparo dos leucócitos do sangue periférico humano.....	35
4.6 Internalização – Incubação das culturas com os fármacos de referência.....	35

4.7	Análise dos dados por citometria de fluxo.....	36
4.8	Determinação da capacidade de redução de internalização de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano.....	37
4.9	Quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante das culturas.....	38
5	Análises estatísticas.....	38
6	RESULTADOS.....	40
6.1	Padronização da inovação metodológica preditiva <i>in vitro</i> utilizando como modelo a internalização de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano e avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo.....	40
6.1.2	Marcação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com fluorocromo FITC.....	40
6.1.3	Perfil hematológico dos voluntários participantes do estudo.....	41
6.2.2	Internalização de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> marcadas com FITC por monócitos do sangue periférico humano.....	42
6.3	Efeito do fármaco benzonidazol, racuconazol e posaconazol na internalização de <i>T. cruzi</i> por monócitos do sangue periférico humano e na viabilidade celular.....	44
6.4	Potencial imunomodulador do benzonidazol, ravuconazol e posaconazol na produção de citocinas e quimiocinas no sobrenadantes de culturas de curta duração de leucócitos do sangue periférico humano.....	50
7	DISCUSSÃO.....	54
8	CONCLUSÃO.....	59
9	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	62

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae. Essa doença constitui o maior problema de saúde pública da América Latina e está inserida no quadro das doenças tropicais negligenciadas. Ela foi descrita pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (Chagas, 1909) e seus estudos incluíram a descrição do ciclo de vida do parasito, seus vetores e diagnóstico.

Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina estão infectadas com o *T. cruzi* e, por ano, 13 mil morrem com a doença, que é uma das principais causas de cardiomiopatia na região (Moncayo e Silveira, 2009). A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, sendo que atualmente a Bolívia tem o mais alto índice de doença (Chatelain, 2015). A migração de pacientes infectados em larga escala de regiões rurais para áreas urbanas e outras regiões do mundo está expandindo a distribuição geográfica e alterando a epidemiologia da doença de Chagas (Chatelain, 2015).

O *T. cruzi*, normalmente, é transmitido pelo inseto triatomíneo da família Reduviidae, podendo também ocorrer transmissão congênita, através de transfusão sanguínea ou transplante de órgãos e pela ingestão de alimentos ou fluidos contaminados (Brenner, Barral; 2000). Como a maioria dos pacientes portadores de doença de Chagas é contaminada pelas fezes dos triatomíneos infectados, o afastamento desses hemípteros da moradia deve ser o principal enfoque preventivo no controle da doença de Chagas (Villela *et al*; 2009).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é muito complexo apresentando três formas evolutivas entre o vetor e o hospedeiro vertebrado (Figura 1). As formas epimastigotas flageladas são encontradas na porção média do trato digestivo do inseto vetor que se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. Durante o repasto sanguíneo, essas formas são excretadas nas fezes do inseto vetor, penetram na mucosa do hospedeiro mamífero e atingem a corrente sanguínea. Uma vez no sangue do hospedeiro, os parasitos invadem vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, dentre outros) e se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Aproximadamente quatro dias após a infecção, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas rompendo as células infectadas. Essas

formas são liberadas no meio extracelular, podendo infectar as células vizinhas, cair na corrente sanguínea ou serem ingeridas por triatomíneos ainda não parasitados dando continuidade à transmissão da doença (Tanowitz *et al*; 1992).

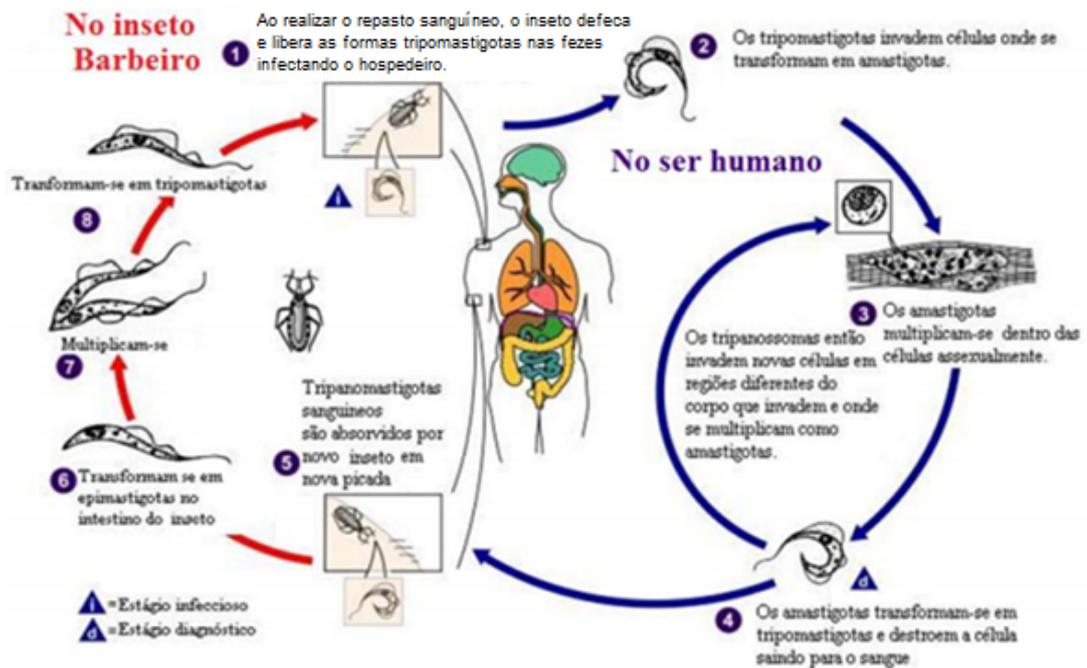


FIGURA 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: CDC, 2013.

Os indivíduos infectados podem apresentar três fases clínicas da doença: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda inicia-se com as manifestações clínicas de sinais de entrada do parasito no organismo e pode persistir por dois meses. Pode ser sintomática ou assintomática dependendo do estado imunitário do indivíduo. O sinal de Romaña ou chagoma de inoculação constituem fortes indícios de infecção por *T. cruzi*. Os principais sintomas e sinais nessa fase são febre, edema, poliadenia, complicações cardíacas, hepatoesplenomegalia e perturbações neurológicas (Brenner *et al*; 2000). Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeprimidos, quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca podem estar associados, levando esses pacientes ao óbito (Rassi *et al*; 2000). A fase subsequente, conhecida como crônica indeterminada, não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico e pode durar vários anos. É aceita a idéia de que a maioria dos

portadores da doença de Chagas persiste nessa fase pelo resto de suas vidas. Dentre os pacientes infectados, uma proporção pequena de indivíduos evolui para a fase crônica cardíaca da doença (20-30%), durante a qual são identificados sintomas de comprometimento cardíaco (miocardite grave) com aumento do volume do coração (cardiomegalia). A desnervação mioentérica durante a fase crônica é a principal responsável pelo aparecimento da forma digestiva da doença de Chagas, que tem prevalência de cerca de 10%, e é caracterizada pelo aumento do diâmetro de regiões do trato digestivo, denominados "megas", caracterizados por alterações no esôfago e cólon, sendo denominadas megaesôfago e megacolon, respectivamente (Brener & Gazinelli, 1997).

## 1.2 Resposta imune na doença de Chagas

As formas infectivas do *T. cruzi* ao serem depositadas na pele do hospedeiro por triatomíneos infectados, se deparam com as barreiras iniciais do sistema imune inato, que incluem barreiras físicas (pele e mucosas), macrófagos, células dendríticas, células NK e proteínas do sistema complemento (Ferreira, 2002; Tarleton, 2007). Na tentativa de controlar a infecção pela resposta imune do hospedeiro, ocorrem a detecção e destruição dos parasitos diretamente, em especial por células dendríticas e macrófagos. A ativação dessas células ocorre com o intuito de potencializar suas funções como apresentadoras de antígenos, e conseqüentemente, direcionar uma resposta imune adaptativa eficiente (Borges, 2013). A resposta imune inata é responsável por controlar a replicação do parasito no início da infecção, assim como preparar o sistema imune para gerar a resposta adquirida preferencialmente do Tipo 1 (Gazzinelli e Denkers, 2006; Tarleton, 2007).

As citocinas desempenham importante papel na regulação da resposta imune e seguramente estão envolvidas tanto na resistência quanto em mecanismos relacionados ao desenvolvimento da sintomatologia da doença de Chagas (Vitelli-Avelar *et al*, 2008).

Diferentes estudos mostram que durante a fase aguda da doença de Chagas ocorre uma forte ativação do sistema imune, devido à produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo *T. cruzi*. Em hospedeiros infectados tem sido observado o aumento da atividade lítica das células do hospedeiro pelo aumento de populações linfocitárias com marcadores característicos das células NK (natural killer). O macrófago responde à infecção pelo *T. cruzi* produzindo IL-12 e outras citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ , que irão induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos T. O IFN- $\gamma$  por sua vez irá estimular os

macrófagos a produzirem mais IL-12. Macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , tem um papel direto no controle da replicação do *T. cruzi* através da indução da produção de óxido nítrico, espécie reativa tóxica que contribui para morte dos parasitos (Vespa; Cunha; Silva, 1994). Outras citocinas como IL-1- $\beta$ , IL-10 e quimiocinas como CCL2, CCL5 e CXCL8 são produzidas pelos macrófagos ativados durante a imunidade inata, para tentar controlar a infecção pelo *T. cruzi* e para mobilizar células imunes que podem contribuir para uma resposta efetora ao longo da infecção (Borges, 2013).

O sistema imune do hospedeiro é fundamental para o controle da parasitemia, mas, por outro lado, pode contribuir para a progressão da cardiomiopatia chagásica (Dutra, Rocha, Teixeira, 2005). É interessante ressaltar que o parasito está presente em pacientes assintomáticos e naqueles com a forma cardíaca da doença de Chagas (Jones *et al*; 1993; Zhang; Tarleton, 1999). A persistência do parasito depende da combinação de diversos fatores, incluindo liberação de moléculas que interferem na resposta imune. Por outro lado, tem sido demonstrado que o *T. cruzi* é capaz de suprimir a ativação de linfócitos, reduzindo sua habilidade de resposta contra antígenos do parasito. O equilíbrio entre a persistência do parasito na infecção e a resposta imune do hospedeiro estabelece a forma clínica indeterminada da doença de Chagas. Por outro lado, o desequilíbrio entre um longo período da persistência do parasito e o sistema imune do hospedeiro leva à resposta inflamatória que resulta nas lesões características da doença de Chagas crônica (Sathler-Avelar *et al*; 2012). Desta forma, a manutenção do parasito em tecidos do hospedeiro seria resultado de estratégias evasivas utilizadas pelo *T. cruzi*. Um provável mecanismo de evasão do sistema imune é devido à exibição diferencial de epitopos antigênicos por células infectadas (Buscaglia *et al*; 2006). Segundo Souza e colaboradores (2007) o *T. cruzi* é capaz de induzir a expressão diferencial de moléculas coestimuladoras por monócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Souza *et al*; 2004).

Estudos prévios realizados por nosso grupo demonstraram que uma resposta imune pró-inflamatória mediada por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é relevante para potencializar a atividade de drogas anti-*T. cruzi*, levando a uma intervenção terapêutica efetiva (Sathler-Avelar *et al*; 2006; Sathler-Avelar *et al*; 2008). Apesar do grande número de estudos sobre a resposta imune após a infecção por *T. cruzi*, existem relativamente poucos trabalhos sobre o impacto do tratamento nesta resposta. Foi demonstrado previamente que o tratamento com benzonidazol induz células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup> a produzirem IFN- $\gamma$  e que IL-10 produzida por células T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B são, supostamente, elementos-chave na modulação da resposta imune e de

controle de danos teciduais induzidos pela resposta pró-inflamatória (Sathler-Avelar *et al*; 2006; Sathler-Avelar *et al*; 2008). Além disso, após o fim desta terapia, ocorre uma redução substancial do número de interações entre diferentes marcadores. Entretanto, a produção de IL-10 é preservada, o que sugere que esta molécula possa ser capaz de modular a imunidade protetora (Campi-Azevedo *et al*; 2015).

### 1.3 Quimioterapia

O tratamento clínico da doença de Chagas é baseado na administração de dois compostos nitroheterocíclicos: benzonidazol (BZ, Radanil ou Rochagan, Roche, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) e nifurtimox (NFX, Lampit, Bayer, 3-metil-4-[5'-nitrofurfurilidenoamino]tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido). O nifurtimox teve seu uso descontinuado no Brasil. Atualmente o Brasil é o único fornecedor mundial do benzonidazol. O governo brasileiro assumiu a responsabilidade de produção em acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e a *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi - organização sem fins lucrativos criada pelos Médicos Sem Fronteiras), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e Instituto Pasteur. O Ministério da Saúde articulou uma parceria público-privada, que integrou o Laboratório Nortec QUÍMICA S.A. (Indústria de insumos farmacêuticos) na produção da matéria-prima e o seu beneficiamento pelo Lafepe (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) que adquiriu da Roche a tecnologia de fabricação do benzonidazol (OPAS/OMS Brasil, 2011).

O benzonidazol e o nifurtimox apresentam uma eficácia muito limitada. Cançado (1999) observou que o benzonidazol curou 76% dos pacientes portadores de doença de Chagas tratados na fase aguda e apenas 8% dos pacientes tratados na fase crônica. Além da baixa eficácia, ambos compostos apresentam diversos efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, vômito, emagrecimento, leucopenia, neuropatia e dermatopatia alérgica (Rassi & Luquetti, 1992). Dentre as causas dessa baixa eficácia podem-se citar as variações na susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* aos compostos, as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis desses fármacos, estágio da doença, fisiologia do hospedeiro e os efeitos colaterais indesejáveis que muitas vezes levam à interrupção do tratamento (Urbina, 2010). A descoberta de compostos terapêuticos mais eficazes e mais seguros é necessário para aumentar a eficácia do tratamento da doença de Chagas, principalmente na fase crônica da doença (Miranda *et al*; 2015).

Estudos mostram que os portadores da doença de Chagas na fase crônica devem ser clinicamente tratados, a fim de eliminar o *T. cruzi*, evitar novos focos inflamatórios e a extensão das lesões teciduais, promover a regeneração de tecidos (prevenir a fibrose) e reverter fibrose existente (Coura, Perreira 2011). Devido a essa melhora no quadro clínico e diminuição da parasitemia é muito importante o tratamento na fase crônica da doença, melhorando assim a condições de vida do paciente. Entretanto, um recente estudo o BENEFIT mostrou dados divergentes. Nesse estudo 394 indivíduos portadores da doença de Chagas com faixa etária entre 18 e 75 anos foram analisados. Esses indivíduos apresentavam dois exames sorológicos positivos para *T. cruzi*, e também evidência de cardiomiopatia. Eles receberam aleatoriamente o benzonidazol (27,5%) ou o placebo (29,1%) e foram acompanhados por 5 anos. Os dados mostraram que o uso do benzonidazol em portadores de doença de Chagas crônica, ajudou a reduzir significativamente o número de parasitos no soro dos pacientes, mas eles não apresentaram melhora clínica cardíaca (Morillo; et al 2015).

No mecanismo de ação de ambas drogas, o grupo nitro é reduzido por enzimas nitroredutases produzindo radicais livres intermediários e metabólicos eletrofílicos. O mecanismo de ação do benzonidazol ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que o benzonidazol inibe o crescimento do *T. cruzi* sem estimular a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Provavelmente metabólitos reduzidos produzidos a partir dessa droga se ligam covalentemente aos componentes do parasito como DNA, lipídeos e proteínas, inibindo o seu crescimento (Días de Toranzo *et al*; 1988). Por outro lado, a ação do nifurtimox se deve ao radical nitroreduzido do fármaco que pode reagir com o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e este produzir peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do peróxido de hidrogênio com o ânion superóxido produzindo radical hidroxila (OH $\cdot$ ), um dos radicais de baixa massa molecular mais tóxico (Tappel, 1973). Ele se liga ao DNA e proteínas do parasito, danificando-os.

Apesar de serem utilizadas no tratamento da doença de Chagas, nenhum desses compostos é considerado uma droga ideal, pois causam vários efeitos colaterais e tem eficácia limitada, especialmente em pacientes na fase crônica da doença (Rocha *et al*; 2007; Soeiro *et al*; 2009). Estas limitações destacam a urgência para a identificação e desenvolvimento de novos compostos tripanossomicidas para substituir os compostos utilizados atualmente (Romanha *et al*; 2010).

Recentemente outras abordagens quimioterapêuticas para o tratamento da doença de Chagas estão sendo pesquisadas. Dentre elas, podemos citar: uso de inibidores da biossíntese de esterol, combinação de drogas, estudo de enzimas-alvo de interesse como tripanotona redutase, cisteína protease, DNA topoisomerase e outras abordagens (Urbina, 1999; Coura & Castro, 2002).

Pesquisas feitas durante as duas últimas décadas têm demonstrado consistentemente que o *T. cruzi*, como a maioria dos fungos e leveduras, requer esteróis específicos para a viabilidade e proliferação celular em todas as fases do seu ciclo de vida. Em particular, a via de biossíntese do ergosterol foi validada quimicamente *in vitro* em vários passos. No entanto, vários estudos têm mostrado que inibidores da biossíntese de ergosterol disponíveis comercialmente, tais como, o cetoconazol, o itraconazol ou terbinafina, são eficazes no tratamento de doenças fúngicas e apresentam atividade contra o *T. cruzi* (Urbina, 2002; Urbina e Docampo, 2003).

Os novos compostos triazólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, também foram testados e apresentaram a capacidade de induzir a cura parasitológica nos estágios agudos e crônicos da doença de Chagas, como o posaconazol e ravuconazol. O posaconazol (POS, Noxafil, Shering-Plough, 2,5-anidro-1,3,4-trideoxi-2-C-(2,4-difluorofenil)-4-[[4-[4-[4-[1-((1S,2S)-1-etil-2-hidroxi-propil]-1,5-dihidro-5-oxo-4H-1,2,4-triazol-4-yl)]fenil]-1-piperazinil]fenoxi]metil]-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-D-treo-pentitol) é uma droga antimicótica de amplo espectro empregada para o tratamento de infecções fúngicas. O posaconazol foi utilizado no tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi* nas fases aguda e crônica da infecção. Os resultados mostraram que essa droga foi capaz de prolongar a sobrevivência, controlar melhor a parasitemia e induzir a cura mais eficientemente que o benzonidazol (Molina *et al*; 2000; Urbina *et al*; 2000). O ravuconazol (RAV, BMS-207 147, Bristol-Myers Squibb, 4-[2-[(1R,2R)-2-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxi-1-metil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propil]-4-tiazolil]-benzonitrila), um antimicótico sistêmico, também apresentou excelente atividade *in vitro* e *in vivo* na infecção pelo *T. cruzi* murina, com 70% de cura na fase aguda. Entretanto, na fase crônica, essa droga não demonstrou atividade anti-parasitária (Urbina, 2003). Ambos os fármacos estão em fase de estudos clínicos para o tratamento específico da doença de Chagas (Urbina, 2010).

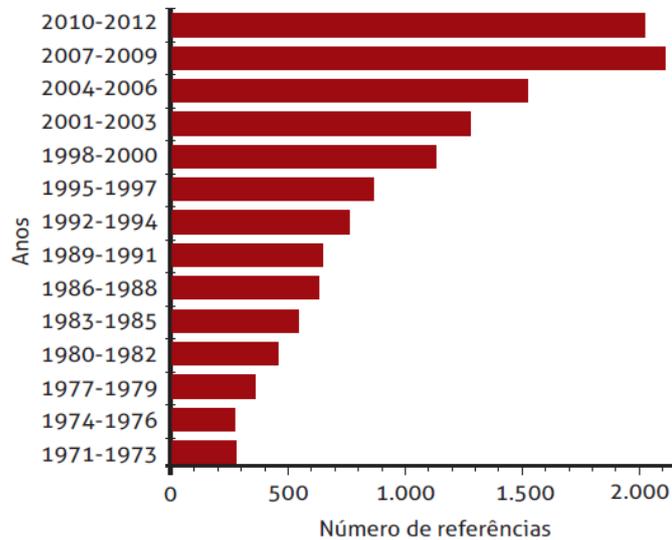
A anfotericina B é um antibiótico isolado do actinomiceto *Streptomyces spp*, com atividade antimicótica principalmente, dependente de sua ligação ao ergosterol, um esterol presente na membrana de fungos. Sabe-se que esse antifúngico também tem ação antiparasitária, sendo por isso utilizado como segunda opção no tratamento de pacientes com

leishmaniose quando o parasito se manifesta resistente à pentamidina (Golenser *et al*; 1999), com mais de 97% de cura registrada (Thakur *et al*; 1999). Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* pertencem à mesma família (Trypanosomatidae) e, em virtude disto, utilizamos a anfotericina B para avaliar sua ação tripanomicida em epimastigotas de *T. cruzi* para avaliar o seu efeito.

#### **1.4 Importância de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas**

A indústria farmacêutica apresentou, ao longo de sua história, um ritmo acelerado de inovações tecnológicas que resultaram em um fluxo contínuo de novos produtos no mercado. Essas inovações foram quase sempre implementadas por empresas a partir de elevados investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) tecnológico e em estreita cooperação com outras instituições, em geral públicas ou sem fins lucrativos (Bastos, 2006). Entretanto, no período entre 1975 e 2004, apenas 1% dos 1.535 novos fármacos registrados foram destinados às doenças tropicais (Dias e Dessoy, 2009). Como uma das ações tomadas no objetivo de se intervir nessa situação, o DNDi pesquisa e desenvolve novos tratamentos para essas doenças e tem como parceiros fundadores o Instituto Pasteur na França, a FIOCRUZ no Brasil, o Ministério da Saúde da Malásia e os institutos de pesquisa clínica da Índia e do Quênia (Pontes, 2009).

Apesar dos impactos socioeconômicos provocados pela doença de Chagas e de sua relevância epidemiológica, existe claro desinteresse da indústria farmacêutica na pesquisa e produção de medicamentos para essa doença, uma vez que sua demanda se restringe à população de baixa renda de países da América Latina, não havendo, portanto, perspectivas de lucro. A complexidade da doença e os baixos investimentos em pesquisa nessa área ajudam a explicar a falta de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas em várias décadas. Segundo dados da Agência Reguladora para Drogas e Alimentos americana, *US Food and Drug Administration* (FDA), nos últimos três anos, não houve nenhum registro de novos medicamentos para tratar doenças negligenciadas. Contudo, há crescente interesse sobre o assunto no meio acadêmico, especialmente nas pesquisas desenvolvidas nas universidades públicas da América Latina (Figura 2). Nos últimos cinco anos, foram publicados em média setecentos trabalhos por ano sobre doença de Chagas (Cunha-Filho, 2012).



**FIGURA 2:** Evolução do número de publicações científicas sobre doença de Chagas nos últimos anos (Cunha-Filho, 2012).

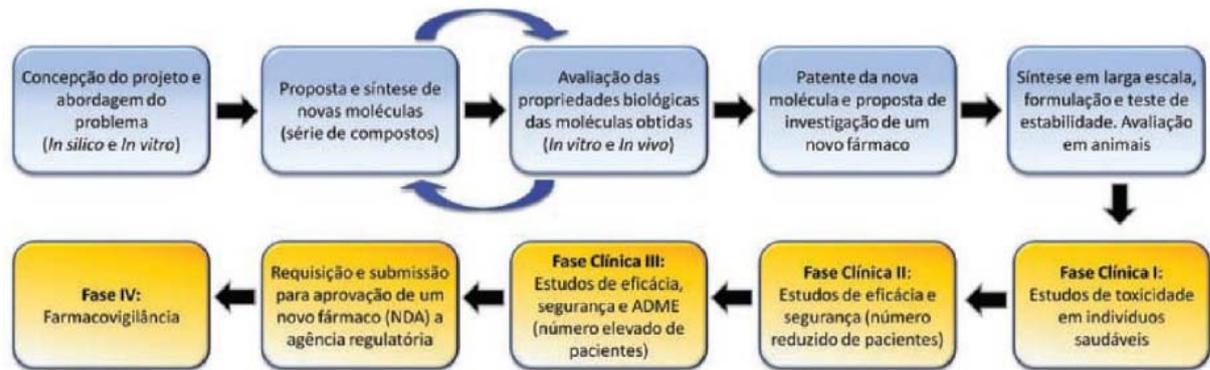
### 1.5 O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas. Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos envolvidos nas diferentes doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (Guido & Oliva, 2010).

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (Guido & Oliva, 2010).

Este processo é dividido em duas grandes fases: (i) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (ii) desenvolvimento (ou clínica) (Lombardino & Lowe, 2004), como mostra a Figura 3. Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de

representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *new chemical entities*) com potencial de desenvolvimento clínico (Guido & Oliva, 2010).



**FIGURA 3:** Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês *new drug application*). Os retângulos representam em azul a fase (i) - pré-clínica ou pesquisa básica e em amarelo, a fase (ii) – clínica. Fonte: Guido & Oliva, 2010.

Neste contexto, a descoberta de drogas nos últimos 30 anos tem sido possível por meio da introdução de bioensaios *in vitro* de grande escala, capazes de avaliar muitas amostras em tempo curto e, assim, fornecer resultados de testes em replicatas suficientes que possibilitem análise estatística consistente. Esse processo é conhecido como *screening* (ou triagem) para atividade biológica e os sistemas de ensaios usados são de importância fundamental para o sucesso do programa de bioprospecção (Bolzani, 2004).

### 1.5.1 Prospecção de moléculas potencialmente antiparasitárias por meio dos ensaios biológicos convencionais

Os ensaios baseados em cultivo celular ainda são considerados ferramentas promissoras para a pesquisa de triagens visando à descoberta de novos fármacos antiparasitários, antitumorais e imunomoduladores. O uso destes ensaios, que mimetizam especificamente o ambiente *in vivo*, pode levar à predição de maior acurácia no processo. Inovações em processos e ensaios para descoberta e desenvolvimento de fármacos para doenças tropicais são cruciais. Plataformas translacionais compostas por ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* podem prever com mais confiança a eficácia de candidatos a fármacos para as

triagens clínicas, o que permite a seleção precoce de compostos que não estão dentro dos critérios adotados e compreendem uma necessidade real de programas de descoberta de novos fármacos para a doença de Chagas (Moraes *et al*; 2014). Uma limitação que é também crucial na identificação de tais compostos é a falta de ensaios adequados para avaliar eficácia dos compostos *in vitro* (Canavaci *et al*; 2010).

Neste contexto, os ensaios utilizados para a triagem de drogas com atividade citotóxica para protozoários como o *T. cruzi* compreendem diferentes processos, incluindo a utilização do parasito íntegro (forma livre ou intracelular) ou enzimas específicas de seu metabolismo, como alvo celular (Falconnet *et al*; 2006). Estas metodologias que utilizam parasitos na sua forma livre, incluem o uso de sua forma axênica, no qual o parasito é cultivado na forma encontrada na corrente sanguínea (Bodley *et al*; 1995). Vários ensaios colorimétricos e fluorimétricos *in vitro* têm sido desenvolvidos para triagem de compostos anti-*T. cruzi* e são mais acurados e objetivos do que os ensaios visuais de contagem por microscopia ótica, que são laboriosos, passíveis de erros humanos e consomem muito tempo. Epimastigotas de *T. cruzi* podem ser obtidas em abundância de culturas axênicas e a eficácia de compostos pode ser avaliada utilizando-se várias abordagens, incluindo manual (contagem dos parasitos por microscopia ótica), espectrofotométricas (ensaios colorimétricos utilizando MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio para avaliação da viabilidade celular) ou fluorimétricos (quantificação do crescimento do parasito). Nestes ensaios, linhagens de *T. cruzi* expressam genes repórteres, tais como, a luciferase e proteínas fluorescentes. Outros métodos eficientes para quantificar parasitos em ensaios de triagem de drogas usam parasitos geneticamente modificados que expressam o gene da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli*, LacZ. Embora usado amplamente e eficaz, este método depende de uma leitura final após a adição de detergente e um substrato a ser convertido. Ademais, estes ensaios utilizando formas epimastigotas livres não refletem verdadeiramente a eficácia dos compostos nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasito que estão presentes em mamíferos (tripomastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares) e não são capazes de avaliar a capacidade das drogas em penetrar eficientemente nas células do hospedeiro. Além disso, estes ensaios são laboriosos e de difícil execução para triagem em grande escala (*high throughput screening*). Ensaios mais adequados para detecção de compostos ativos mais apropriados para *T. cruzi*, que utilizam a forma amastigota têm sido modificados pelo uso de parasitos expressando o gene da  $\beta$ -galactosidase e utilizados em maior escala (Canavaci *et al*; 2010).

Os ensaios que utilizam *T. cruzi* na forma intracelular, requerem o crescimento intracelular dos mesmos em células como fibroblastos, linhagens estabelecidas de células humanas ou murinas (Buckner *et al*; 2003). Nestes procedimentos além de se avaliar a atividade citotóxica para o parasito, pode-se fazer inferências sobre a toxicidade seletiva dos compostos avaliados já que se determina também a viabilidade celular, o que simplifica muito a triagem para drogas de maior seletividade (Buckner *et al*; 1996; Romanha *et al*; 2010). Contudo, uma das restrições destas metodologias é que a triagem de drogas para tais patógenos intracelulares é complicada devido à dificuldade de determinar o número de patógenos que permanecem após o tratamento com as drogas (Serenio *et al*; 2001; Romanha *et al*; 2010).

### **1.6 Ensaios para avaliação de toxicidade e potencial imunomodulador *in vitro* utilizando sangue total**

A imunotoxicidade de drogas e outros compostos de uso humano é bem reconhecida e precisa ser avaliada em ensaios de triagem. Imunotoxicidade pode ser definida como o efeito adverso de agentes químicos ou não, sobre o sistema imune. O efeito pode aumentar a atividade imune manifestada pela alta hiper sensibilidade ou autoimunidade, ou diminuição da atividade imune, com reduzida habilidade de controlar infecções ou aumento da incidência do câncer. Até o presente, poucos modelos *in vitro* e *in vivo* estão disponíveis para avaliação de imunotoxicidade de uma maneira padronizada. As diferenças na resposta do sistema imune do hospedeiro, bem como a especificidade de alguns dos agentes a serem testados, tornam necessário o desenvolvimento de novos sistemas preditivos, utilizando células humanas *in vitro* (Carfi *et al*; 2007).

No que concerne aos agentes potencialmente perigosos, imunotóxicos, vários pesquisadores estão centrados na padronização de metodologias para detecção de toxicidade de novos compostos *in vitro*. Estes métodos incluem a utilização de leucócitos humanos e têm sido amplamente utilizados em estudos de imunofarmacologia (Langezaal *et al*; 2001). Como o sangue de doadores de pacientes é facilmente acessível, numerosos estudos têm sido conduzidos utilizando células do sangue periférico humano. Entretanto, o processo de purificação dos diferentes tipos de células é muito trabalhoso. Ademais, a alta sensibilidade de leucócitos é facilmente afetada e/ou modulada por tais procedimentos. Assim, uma investigação utilizando sangue total humano está se tornando mais comum no meio científico.

Recentemente um grande número de aplicações utilizando sangue total humano em farmacologia e toxicologia tem emergido. O modelo pode ser desenvolvido utilizando-se estímulos *in vitro* para acessar qualquer propriedade imunomoduladora aguda de agentes testes. Assim um modelo simples de sangue total oferece uma variedade de oportunidades para se avaliar as funções imunes como liberação de citocinas e funções de células imunes como a resposta celular e humoral. A avaliação neste sistema também permite analisar o efeito de agentes químicos nas funções de macrófagos e linfócitos T e inferir seu potencial citotóxico e imunomodulador (Wagner & Jurcic, 1991; Inoue *et al*, 2002).

Os ensaios de estimulação *in vitro* de sangue total são úteis para quantificação de citocinas e quimiocinas devido ao fácil acesso às amostras de doadores saudáveis ou pacientes e requerem o mínimo de processamento das amostras. Assim, o ensaio mimetiza o microambiente natural *in vivo* e permite estudar a ativação celular e a produção de citocinas e quimiocinas *in vitro*. A estimulação de sangue total tem sido utilizada para investigar a resposta celular a vários estímulos, incluindo endotoxina bacteriana (LPS), antígenos, alergênicos e antibióticos. Vários usos clínicos de ensaios de estimulação de sangue total têm sido indicados para avaliação de doenças autoimunes, monitoramento de drogas, eficácia de vacinas e imunotoxicidade. Portanto, cultivo de sangue total pode ser útil para se estudar efeitos de potenciais alergênicos e/ou substâncias antigênicas e drogas na ativação de células imunes e secreção de citocinas e quimiocinas (Thurm & Halsei, 2005).

Até o presente, existem poucos ensaios validados *in vitro* e progressos significantes podem ser alcançados para promover o estabelecimento de novos métodos para medir imunotoxicidade (Carfi *et al*, 2007).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Como já mencionado anteriormente, as opções para o tratamento clínico da doença de Chagas estão restritas a apenas dois compostos, benzonidazol e nifurtimox, que foram descobertos há cerca de 40 anos. Eles possuem baixa eficácia de cura, principalmente na fase crônica da doença, quando a maioria dos casos da doença é diagnosticada. Além disso, essas drogas são altamente tóxicas e provocam efeitos colaterais significativos aos pacientes. Por isso, a necessidade da descoberta de novas drogas para tratamento da doença de Chagas é urgente.

O nosso grupo tem realizado pesquisas com vistas à descoberta de protótipos úteis para o desenvolvimento de novos fármacos com atividades anti-parasitária, anti-tumoral e imunomoduladora. Essa pesquisa está apoiada em estudos e projetos para a melhoria dos conhecimentos sobre a biodiversidade, síntese de novas moléculas e desenvolvimento de ensaios biológicos. Além disso, o grupo possui ampla experiência na proposição de novas metodologias e processos envolvendo a citometria de fluxo. Recentemente, foi proposto por nós, o estabelecimento de protocolos para avaliação da capacidade de leucócitos do sangue periférico humano em internalizar formas epimastigotas do *T. cruzi* por meio de fagocitose (Gomes *et al*; 2012). Um ensaio funcional inovador para avaliação do potencial leishmanicida e imunomodulador de novos compostos foi também proposto por nosso grupo em 2012, com o foco para inovação farmacêutica (Bandeira *et al*; 2012). Esse ensaio se mostrou uma excelente ferramenta para estudos de interação parasito-hospedeiro e um bom método de triagem para avaliação de atividade biológica de extratos vegetais e substâncias sintéticas.

O ensaio proposto é uma metodologia de alta sensibilidade e que permite a avaliação de um grande número de compostos de forma sistemática e sem influência do analista. O tipo de abordagem preconizada para este estudo, empregando amostras de sangue total e a metodologia de interação célula-parasito *in vitro*, permite traçar rapidamente o perfil de atividade biológica das substâncias a serem testadas, possibilitando a análise simultânea de todas as populações de leucócitos presentes no sangue periférico. A utilização do sangue total durante as estimulações com as substâncias, permite a avaliação da influência de componentes autólogos solúveis que possam ser relevantes fisiologicamente, como anticorpos, receptores solúveis, idiotipos, citocinas, proteínas e outros elementos, que poderiam estar contribuindo diretamente ou indiretamente para a análise biológica das substâncias testadas. As técnicas de análises biológicas *in vitro* convencionais, não permitem este tipo de avaliação. Dessa forma, trabalhando em um sistema com características mais próximas àquelas presentes *in vivo*, pode-se obter informações mais detalhadas e precisas em relação à atividade biológica das substâncias a serem testadas.

Neste contexto, este projeto visa estabelecer um ensaio funcional pela avaliação da internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano, utilizando a citometria de fluxo, como metodologia preditiva para a avaliação do potencial anti-*T. cruzi* e citotóxico de compostos úteis para o desenvolvimento de novos fármacos para doença de Chagas e análise simultânea do potencial imunomodulador dos mesmos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Padronizar o ensaio funcional utilizando a internalização de formas epimastigotas de *T. cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano por citometria de fluxo.

#### 3.2 Específicos

Determinar o perfil de marcação das formas epimastigotas do *T. cruzi* com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC);

Analisar a porcentagem de internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* fluorescentes por monócitos do sangue periférico humano;

Avaliar o efeito dos fármacos benzonidazol, ravuconazol e posaconazol na internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico e na sua viabilidade celular;

Avaliar o potencial imunomodulador do benzonidazol, ravuconazol e posaconazol na produção de citocinas (IL-1- $\beta$ , IL-6 TNF e IL-10) e quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL8) nos sobrenadantes de culturas de curta duração de leucócitos do sangue periférico humano.

## 4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de sangue periférico humano

Leucócitos do sangue periférico foram obtidos de coleta de sangue realizada em 15 indivíduos saudáveis que trabalham no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) que aceitaram participar desse estudo voluntariamente. Esses indivíduos sendo 13 do sexo feminino e 2 do sexo masculino apresentavam faixa etária de 24 a 42 anos. Foram coletados 2 tubos de sangue periférico de cada voluntário, 1 tubo de 10 mL contendo heparina sódica para realização dos experimentos de fagocitose, viabilidade celular e atividade imunomoduladora e 1 tubo de 5 mL contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) para realização do hemograma.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR sob o número CAAE: 43000815.7.0000.5091.

### 4.2 Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas de *T. cruzi*

#### 4.2.1 Cultivo e marcação das formas epimastigotas do *T. cruzi* com FITC

Formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* - Tc grupo II (Zingales *et al*; 2009) foram utilizadas em nosso estudo. A escolha dessa cepa foi devido ao alto perfil de virulência em camundongos (pico de parasitemia no 7º dia após infecção) e ter tropismo por monócitos, a célula alvo desse estudo. A cepa foi obtida através de hemocultura em meio LIT de camundongos experimentalmente infectados. Após crescimento das formas epimastigotas do parasito, as culturas eram repicadas semanalmente para garantir uma boa infectividade durante os experimentos. Essas culturas foram mantidas em incubadora (B.O.D), a temperatura de 26°C ± 0,5 por 7 dias na sua fase logarítmica de crescimento. Os parasitos foram mantidos em garrafas de cultura T25 cm<sup>2</sup> contendo meio nutricional LIT (*liver infusion triptose*, pH 7,2 – Infuso de fígado 5g/L, triptose 5g/L, NaCl 4g/L, KCl 0,4g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8g/L, glicose 2g/L, Hemina 0,66 mL/L, soro fetal bovino 10%, sem antibiótico). A avaliação da qualidade das culturas foi realizada por citometria de fluxo, seguindo critérios morfométricos de tamanho e granulosidade e também por microscopia óptica observando a motilidade e morfologia. Para leitura de pelo menos 5.000 parasitos no citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson), utilizou-se 20µL da cultura e 180µL de solução fixadora Max Facs Fix (MFF) contendo paraformaldeído como agente fixador.

Para a marcação dos parasitos, foi utilizado o protocolo descrito por Gomes e colaboradores (2012). Foi utilizada a concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL, que foram marcados com uma solução de 200  $\mu\text{g/mL}$  de FITC (F7250-1G/SIGMA). A cultura foi incubada em B.O.D. a  $26^\circ\text{C} \pm 0,5$  por 30 minutos e lavada com PBS 1X para retirada do excesso do fluorocromo não absorvido pelo parasito. Foi avaliada a qualidade da marcação através da análise da intensidade média de fluorescência (IMF) apresentada pelos parasitos marcados com FITC no citômetro de fluxo. A marcação com o fluorocromo deveria contemplar 100% dos parasitos utilizados (Figura 4).

#### **4.2.2 Internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* por leucócitos do sangue periférico humano**

Gomes e colaboradores (2012) e Bandeira *et al*, 2012 verificaram que o número ideal de leucócitos para obter um percentual ótimo de internalização de tripanossomatídeos por célula e ainda obter um número satisfatório de eventos a serem lidos no citômetro era 500.000 células e 250.000 parasitos. Diante disto, em nossos ensaios foi utilizado essa proporção de 0,5 parasito por monócitos.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em tubos de 5 ml de poliestireno. No total foram utilizadas amostras de sangue de 15 voluntários saudáveis. Em cada tubo foram incubados 500  $\mu\text{L}$  do sangue, 100  $\mu\text{L}$  do fármaco diluído (em cada condição estabelecida: benzonidazol 100  $\mu\text{M}$ , ravuconazol 10 $\mu\text{L}$  posaconazol 100  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{L}$  de epimastigotas marcadas com FITC e meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, para completar o volume final de 1000  $\mu\text{L}$  por tubo. Os tubos testados foram denominados como controle de leucócitos (500  $\mu\text{L}$  de leucócitos + 500  $\mu\text{L}$  de meio RPMI com soro fetal bovino 10%,) controle de internalização (500  $\mu\text{L}$  de leucócitos + 475  $\mu\text{L}$  de meio RPMI com soro fetal bovino 10% + 25  $\mu\text{L}$  de parasitos marcadas com FITC), grupo tratado leucócitos + fármacos (500  $\mu\text{L}$  de leucócitos+ 400  $\mu\text{L}$  de meio RPMI com soro fetal bovino 10% + 100  $\mu\text{L}$  do fármaco diluído (em cada condição estabelecida: benzonidazol 100  $\mu\text{M}$ , ravuconazol 10  $\mu\text{L}$  posaconazol 100  $\mu\text{M}$  - para verificar a citotoxicidade) e grupo tratado leucócitos+ parasitos+ fármacos (500  $\mu\text{L}$  de leucócitos + 375  $\mu\text{L}$  de meio RPMI com soro fetal bovino 10% + 25  $\mu\text{L}$  de parasitos marcadas com FITC + 100  $\mu\text{L}$  do fármaco diluído (em cada condição estabelecida: benzonidazol 100  $\mu\text{M}$ , ravuconazol 10  $\mu\text{L}$  posaconazol 100  $\mu\text{M}$ ), esses tubos foram incubados em estufa  $37^\circ\text{C}$  sob agitação. Após 6 horas de incubação os tubos descritos acima foram

retirados da estufa 37°C e as suspensões foram submetidas à centrifugação (400 g, 18°C por 7 minutos). Os sobrenadantes (500 µL de cada condição estabelecida) foram aliqotados e armazenados a -70°C, para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas. Posteriormente foram adicionados aos tubos de cultura, 220µL de EDTA 20mM que foram mantidos por 15 minutos em repouso. As amostras foram submetidas à centrifugação (400 g, 18°C por 7 minutos). O sobrenadante foi retirado e as células foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL, contendo 1 µL de anticorpo anti-CD14-PE (Biolegend, cod. 347497). As amostras foram incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz.

Após a marcação, foram adicionados em cada tubo 3 mL de solução de lise de eritrócitos 1X (*FACS lysing solution*, Becton Dickinson). As amostras foram homogeneizadas e os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 400 g, 18°C por 7 minutos e lavadas uma vez com 3 mL de solução de lavagem PBS-WASH (tampão fosfato salínico contendo 5g/L de albumina bovina sérica - BSA - *bovine serum albumin* e 1 g/L de azida sódica, pH 7,2). Os tubos foram submetidos novamente a centrifugação a 400 g, 18°C por 7 minutos. Verteu-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 200µL de solução fixadora MFF. As amostras foram homogeneizadas e mantidas a 4°C no máximo 2 horas até a leitura no citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson). Foram adquiridos um mínimo de 5.000 eventos no “gate” ou janela de monócitos.

### **4.3 Análise da viabilidade celular**

A análise da viabilidade celular foi realizada pela marcação com 7-AAD (7-aminoactinomicina D), conforme protocolo descrito por Rieger e colaboradores (2011) e Bandeira e colaboradores (2012). A marcação com 7AAD é mais econômica e mais eficiente, por isso a escolha dessa marcação. Leucócitos humanos foram incubados com os parasitos por 6 horas, seguindo-se a lise de eritrócitos e marcação com 7-AAD. Para tal, foram adicionados aos tubos de cultura 2,5µL de 7AAD (7-amino actinomicina D, Becton Dickinson, cod. 559925), em um volume final de 200 µL de cultura ressuspensionada em PBS 1X. A cultura foi incubada em banho de gelo, por 10 minutos, ao abrigo da luz, seguindo-se à leitura em citômetro de fluxo. Foram adquiridos um mínimo de 5.000 eventos no “gate” ou janela de monócitos em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson).

#### **4.4 Efeito do benzonidazol, ravuconazol e posaconazol internalização de fomas epimastigotas de *T.cruzi* por monócitos do sangue periférico humano e na viabilidade celular**

##### **4.4.1 Fármacos-controle/referência**

Como drogas de referência anti-*T. cruzi* foram utilizados os fármacos benzonidazol, ravuconazol e o posaconazol. Todos esses compostos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior, pesquisador da Plataforma de ensaios pré-clínicos de triagem de drogas *anti-trypasoma cruzi* (Plabio TC) do GFP/CPqRR.

##### **4.5 Preparo dos leucócitos do sangue periférico humano**

Conforme descrito anteriormente, foram coletados 1 tubo de 5mL de EDTA e 1 tubo de 9mL de heparina sódica de cada indivíduo. As células sanguíneas foram contadas utilizando o contador hematológico Advia 60 Hematology Analyzer, BAYER, que realiza a contagem diferencial em apenas três partes de células, não identifica qual é o tipo do granulócito está sendo contado. O sangue foi transferido para tubos de 15 mL, lavados 2 vezes com PBS 1X 10% SFB. Após essa etapa, foi realizado um ajuste da concentração celular para  $1 \times 10^6$  células/mL em meio contendo PBS 1X 10% SFB. A proporção entre o número de parasitos por células sanguíneas foi de 0.5 parasito para cada célula (0.5:1). Em nossos ensaios utilizamos 500.000 células e 250.000 parasitos, conforme descrito anteriormente.

##### **4.6 Internalização – Incubação das culturas com os fármacos de referência**

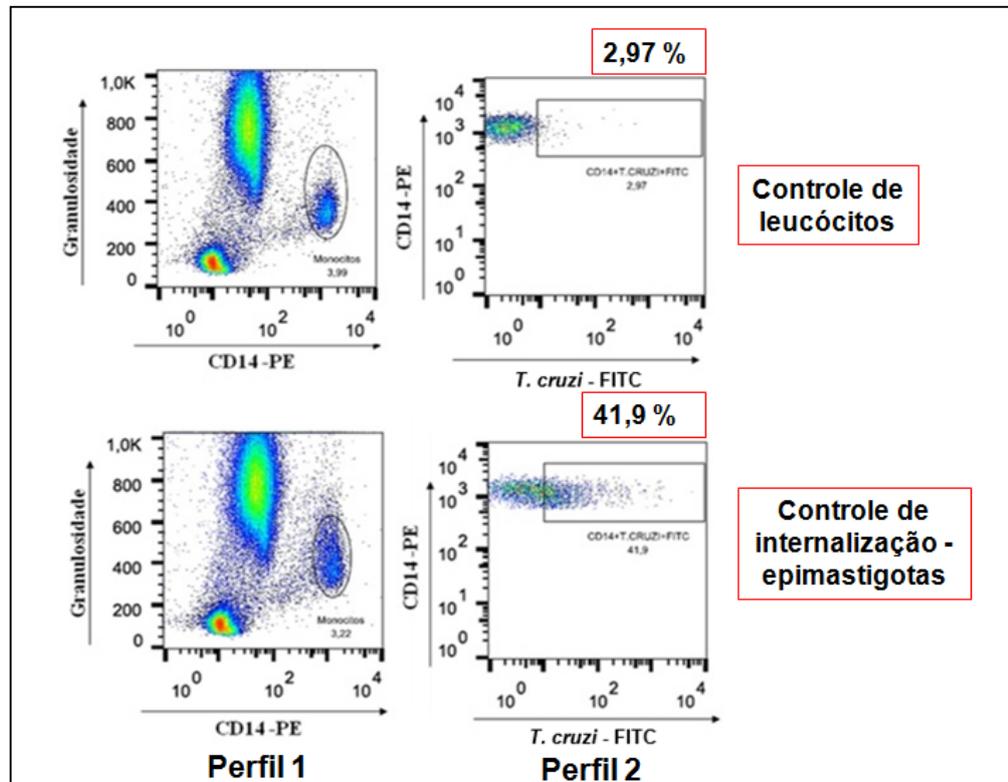
Para a etapa de internalização, amostras de leucócitos foram incubadas na ausência ou presença de várias concentrações de benzonidazol (500, 250, 125, 100, 50, 25, 12,5 e 6  $\mu\text{M}$ ), ravuconazol (40, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,01, 0,001 e 0,0001  $\mu\text{M}$ ) e posaconazol (200, 100, 40 e 50  $\mu\text{M}$ ). Além desses três fármacos avaliamos também a anfotericina (200, 55 e 27,5  $\mu\text{M}$ ) e nifurtimox (80, 20 e 10  $\mu\text{M}$ ). Entretanto, optamos por utilizar em nossos ensaios apenas os três primeiros fármacos (benzonidazol, ravuconazol e posaconazol), devido a alta toxicidade dos dois outros fármacos nas concentrações avaliadas.

Após a avaliação das concentrações das drogas, as mais apropriadas para o ensaio de internalização foram selecionadas, a saber: benzonidazol 100  $\mu\text{M}$ , ravuconazol 10  $\mu\text{M}$  e

posaconazol 100  $\mu\text{M}$ . Essas concentrações foram selecionadas como ideais, pois foram as maiores concentrações testadas de cada fármaco que não induziram morte celular (segundo critério de ter no máximo de 20% de células positivas para 7-AAD). As amostras contendo formas epimastigotas vivas fluorescentes de *T. cruzi*, leucócitos do sangue periférico e os compostos foram incubados em tubos de 14 mL de polipropileno sob agitação constante a 37°C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  por 6h.

#### 4.7 Análise dos dados por citometria de fluxo

No mínimo 5.000 monócitos/tubo foram obtidos para aquisição das amostras em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson). Para a aquisição dos dados foi utilizado o software CELLQuest™ versão 3.0 e para análise dos dados foi utilizado o software FlowJo versão 10.X como recomendado pelos respectivos fabricantes. A Figura 4 exemplifica, de forma esquemática, a análise seletiva da população de monócitos do sangue periférico humano e análise da internalização de formas epimastigotas de *T. cruzi* por esse tipo celular. A seleção de monócitos foi realizada utilizando-se gráficos de FL-2/ $\alpha$ -CD14-PE (ficoeritrina) versus granulocidade, sendo os monócitos selecionados como células Granulocidade<sup>média</sup>CD14<sup>+++</sup>. A análise da taxa de parasitos internalizados foi determinada em relação às amostras controles incubadas na ausência de droga comparado com as amostras incubadas com as drogas benzonidazol, ravuconazol e posaconazol. Essa análise foi realizada na ausência e na presença de parasitos (Figura 4).



**FIGURA 4:** Gráficos de densidade representativos da análise da internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano. A seleção da população de monócitos foi realizada utilizando-se gráficos de densidade de FL-3/ $\alpha$ -CD14-PE versus granulosidade e os monócitos selecionados como células Granulosidade<sup>média</sup>CD14<sup>+++</sup>. Perfil 1: na ausência de parasitos. Perfil 2: na presença de parasitos, o percentual de formas epimastigotas do *T. cruzi* fluorescentes internalizadas está mostrado por um retângulo, representando a dupla positividade de marcação em gráficos de densidade de FL1 (*T. cruzi*) marcado com isotiocianato de fluoresceína-FITC) versus FL2/CD14-PE. No controle de leucócitos consideramos o corte de 4%.

#### 4.8 Determinação da capacidade de redução de internalização de formas epimastigotas de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano

A determinação da capacidade de redução da internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* foi realizada através da seguinte fórmula: Índice (CE-cultura exposta/CC- cultura controle) x 100, onde CE representa a porcentagem de parasitos internalizados por monócitos circulantes na ausência ou presença de drogas e CC representa a porcentagem equivalente ao sinal de fluorescência inespecífico na presença do solvente utilizado para solubilização das drogas (DMSO a 0,01%) ou solução de fármacos nas respectivas concentrações empregadas.

#### 4.9 Quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante das culturas

Após a incubação das amostras de sangue periférico por 6 horas, conforme descrito anteriormente, 250 µL do sobrenadante de cultura de cada amostra foi aliquotada em microtubos de 0,5 mL e armazenada a -70°C. Essas amostras foram utilizadas para quantificação de citocinas e quimiocinas nas condições estabelecidas. A metodologia empregada foi o ensaio citofluorimétrico com microesferas fluorescentes – CBA (*Cytometric Bead Array*, Becton Dickinson). Os kits utilizados foram: Human TH1, TH2, TH17 Cytokine Kit - IL 17, INF- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 e o Inflammatory kit - IL-1- $\beta$ , IL-10, TNF, IL-12 P70, e para a dosagem de quimiocinas foi o *Human Chemokine Kit* - CCL2, CCL5, IL-8/CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, conforme instruções do fabricante (Becton Dickinson). Foram utilizadas populações de microesferas com intensidades de fluorescência distintas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura específicos para cada citocina/quimiocina a ser analisada, que foram adquiridas no canal FL3 do citômetro de fluxo (FACSverse, Becton Dickinson). As populações de microesferas foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. Posteriormente, as misturas de microesferas foram incubadas com conjugados contendo anticorpos anti-citocinas/quimiocinas específicos associados ao fluorocromo PE, revelados no canal FL2 do citômetro de fluxo. Os ensaios foram realizados empregando-se 25 µL de sobrenadante das culturas, 25 µL da mistura de microesferas e 25 µL do reagente de detecção PE. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção das curvas-padrão que continham concentrações conhecidas das citocinas/quimiocinas. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 3 h, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adquiridas pelo menos 500 microesferas por analito avaliado com o auxílio do software FACS Suite versão 1.0 no citômetro de fluxo FACSverse (Becton Dickinson). Os resultados foram gerados em intensidade média de fluorescência do canal de revelação FL2 e expressos em pg/mL por meio da análise de equação do quinto parâmetro logístico, utilizando-se o software FCAP array v3.0 (Soft Flow).

#### 5 Análises Estatísticas

Em nosso estudo foram utilizadas sangue periférico humano de quinze voluntários sadios, para cada substância-padrão a ser avaliada, em triplicata. Em nossos ensaios, foram realizados controle de parasito livre, células com ou sem droga e célula com ou sem droga +

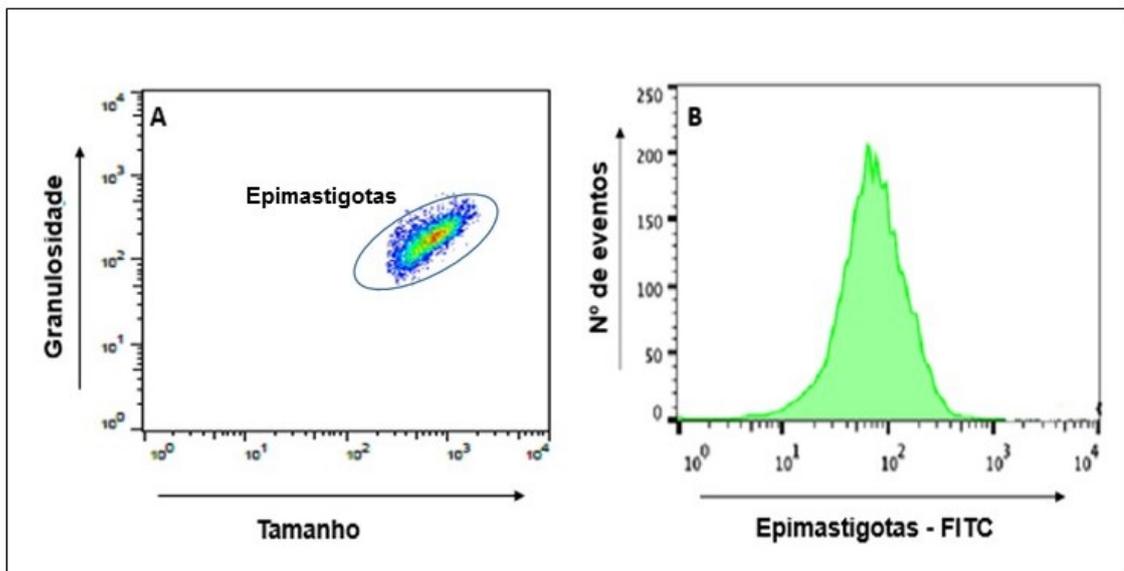
formas epimastigotas do *T. cruzi* fluorescentes. Para as análises estatísticas dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) para comparação entre os grupos. Para a análise comparativa entre os grupos foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. Para a análise comparativa pareada entre dois grupos foi empregado o teste T de Student pareado. Em todos os casos, as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de p foi menor que 0,05.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Padronização da inovação metodológica preditiva *in vitro* utilizando como modelo a internalização de formas epimastigotas de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano e avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo

#### 6.1.2 Marcação de formas epimastigotas de *T. cruzi* com fluorocromo FITC

As culturas de epimastigotas de *T. cruzi* foram escolhidas segundo critérios de qualidade e viabilidade. Foram selecionadas culturas que estavam entre a 3ª e 6ª passagem para garantir sua infectividade. As culturas apresentaram no momento do uso, uma boa mobilidade e morfologia homogênea, observadas ao microscópio óptico. É importante ressaltar que todas as culturas estavam na sua fase logarítmica de crescimento. O perfil observado no citômetro de fluxo apresentado na Figura 5, mostra na Figura 5A um perfil morfométrico de tamanho x granulosidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* com sete dias de cultivo e na Figura 5B demonstra a intensidade média de fluorescência (FL1-FITC) emitida pelos parasitos marcados com FITC. Os dados mostram a integridade dos parasitos e a eficiência da marcação com FITC, contemplando 100% dos parasitos.



**FIGURA 5:** Seleção e marcação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. (A) representa o perfil das formas epimastigotas de *T. cruzi*, selecionadas na janela "gate" em gráfico de densidade de tamanho versus granulosidade. (B) Histograma representativo da intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

### 6.1.3 Perfil hematológico dos voluntários participantes do estudo

O perfil hematológico (série branca do hemograma) dos voluntários participantes do estudo foi analisado para verificação dos valores apresentados no momento da realização dos ensaios e confirmação da global de leucócitos (Tabela 1). Após essa etapa, antes do início do ensaio preditivo, foi realizado um ajuste da concentração celular do sangue periférico coletado para  $1 \times 10^6$  células/mL em meio contendo PBS 1X 10%SFB.

**TABELA 1:** Perfil hematológico dos voluntários saudáveis participantes do estudo (idade e sexo). Foram determinados os valores absolutos da global de leucócitos, contagem de granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas. Os resultados estão expressos em  $\text{mm}^3$ .

Hemogramas ( $10^3 / \text{mm}^3$ )							
	Idade	Sexo	Global de leucócitos	Granulócitos	Linfócitos	Monócitos	Plaquetas
Voluntário 1	29	Feminino	7,30	69,90	1,40	0,70	371,00
Voluntário 2	34	Feminino	8,00	74,00	1,30	0,70	307,00
Voluntário 3	27	Feminino	9,90	64,40	2,30	1,20	319,00
Voluntário 4	26	Feminino	6,40	53,20	2,40	0,50	298,00
Voluntário 5	29	Feminino	8,00	73,70	1,50	0,40	313,00
Voluntário 6	34	Feminino	7,90	74,80	1,30	0,60	237,00
Voluntário 7	27	Feminino	7,50	76,70	1,20	0,50	258,00
Voluntário 8	24	Masculino	7,50	71,50	1,50	0,60	295,00
Voluntário 9	27	Feminino	7,30	70,80	1,20	0,90	256,00
Voluntário 10	29	Feminino	6,70	60,20	1,60	0,90	286,00
Voluntário 11	25	Feminino	9,70	75,90	1,50	0,70	313,00
Voluntário 12	42	Feminino	7,60	64,80	1,80	0,80	292,00
Voluntário 13	27	Masculino	5,20	66,30	1,20	0,40	185,00
Voluntário 14	42	Feminino	7,70	68,70	1,30	1,00	160,00
Voluntário 15	29	Feminino	7,80	68,30	1,40	1,00	254,00

Os resultados do perfil hematológico dos quinze voluntários avaliados durante o estudo demonstraram níveis basais, próximo dos valores de referência para a série branca do hemograma (número absoluto de leucócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas) (Tabela 1).

### **6.2.2 Internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* marcadas com FITC por monócitos do sangue periférico humano**

Na Tabela 2 segue a relação dos voluntários com os respectivos valores da porcentagem de internalização dos parasitos e citotoxicidade celular, pela avaliação da morte celular por incorporação do composto 7-AAD.

Para os ensaios de viabilidade celular, foi utilizado o composto 7-AAD, que é um marcador de perda de integridade de membrana (apoptose tardia ou necrose), permitindo assim quantificar a citotoxicidade dos fármacos. A viabilidade celular pode ser avaliada por mudanças morfológicas ou estruturais da membrana plasmática, alterando a permeabilidade e podendo excluir certos corantes, captar ou reter outros (Coder, 1997). A habilidade destes corantes em entrar na célula em apoptose tardia ou necrose é dependente da permeabilidade da membrana, já que eles não coram células vivas ou em apoptose precoce devido à integridade/seletividade da membrana plasmática (Rieger *et al*; 2011). O uso do 7-AAD no presente protocolo, foi demonstrado por Bandeira e colaboradores em 2012, no estabelecimento desta metodologia. Nestas condições a marcação com 7-AAD era em torno de 15% (células em apoptose tardia/necrose). Desta forma, para os ensaios de viabilidade celular para este estudo, foi estabelecido um critério de 20% de células positivas para 7-AAD (em morte celular) como o valor máximo aceitável para as condições do ensaio com os fármacos propostos para o estudo atual.

**TABELA 2:** Perfil de internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* e citotoxicidade celular por monócitos do sangue periférico dos voluntários saudáveis participantes do estudo, analisados em ensaios de citometria de fluxo. Os dados individuais de internalização estão apresentados como percentual de monócitos que internalizaram as formas epimastigotas do *T. cruzi*. A citotoxicidade celular individual de cada voluntário (morte celular) foi avaliada pelo percentual de incorporação do composto 7-AAD por monócitos do sangue periférico humano.

Exp. 6 horas - Epimastigotas	Controle Fagocitose % célula + parasito	7AAD - Morte até 20%
Voluntário 1	42,50	3,32
Voluntário 2	45,65	4,29
Voluntário 3	55,10	1,67
Voluntário 4	25,10	5,78
Voluntário 5	17,45	6,40
Voluntário 6	33,00	3,67
Voluntário 7	52,93	2,92
Voluntário 8	49,20	3,24
Voluntário 9	73,90	6,47
Voluntário 10	66,13	2,84
Voluntário 11	81,36	5,27
Voluntário 12	52,93	5,80
Voluntário 13	51,56	3,68
Voluntário 14	28,86	6,28
Voluntário 15	45,06	3,90

Os valores representam a média e desvio padrão das triplicatas de cada amostra.

Conforme demonstrado na Tabela 2 foi observada uma grande variação da porcentagem de internalização dos parasitos pelos monócitos do sangue periférico dos voluntários analisados. A porcentagem variou de 17,45% a 81,36%, sendo a média de 48,04%. Esses resultados revelam as diferenças individuais do sistema imune frente a um estímulo exógeno, podendo explicar, pelo menos em parte, a grande variação da resposta à infecção de monócitos circulantes pelo *T. cruzi*. É interessante ressaltar que essa mesma variação de fagocitose entre amostras de sangue periférico foi observada em ensaios empregando formas promastigotas vivas de *Leishmania* spp (Bandeira *et al*; 2012).

A incubação das células com os parasitos por 6h induz morte dos monócitos, com variação de 1,67 a 6,47%, que está dentro dos critérios estabelecidos por Bandeira e colaboradores (2012) como aceitáveis para células 7-AAD<sup>+</sup> no ensaio preditivo (até 20% de células 7-AAD<sup>+</sup>, ou seja, em morte celular). Além desse tempo de 6h, em nosso estudo

realizamos também os ensaios de durante 12 e 24 horas de incubação. Entretanto observamos grande porcentagem de morte celular que foi acima da porcentagem aceitável (20%), então definimos que o tempo de incubação seria por 6h.

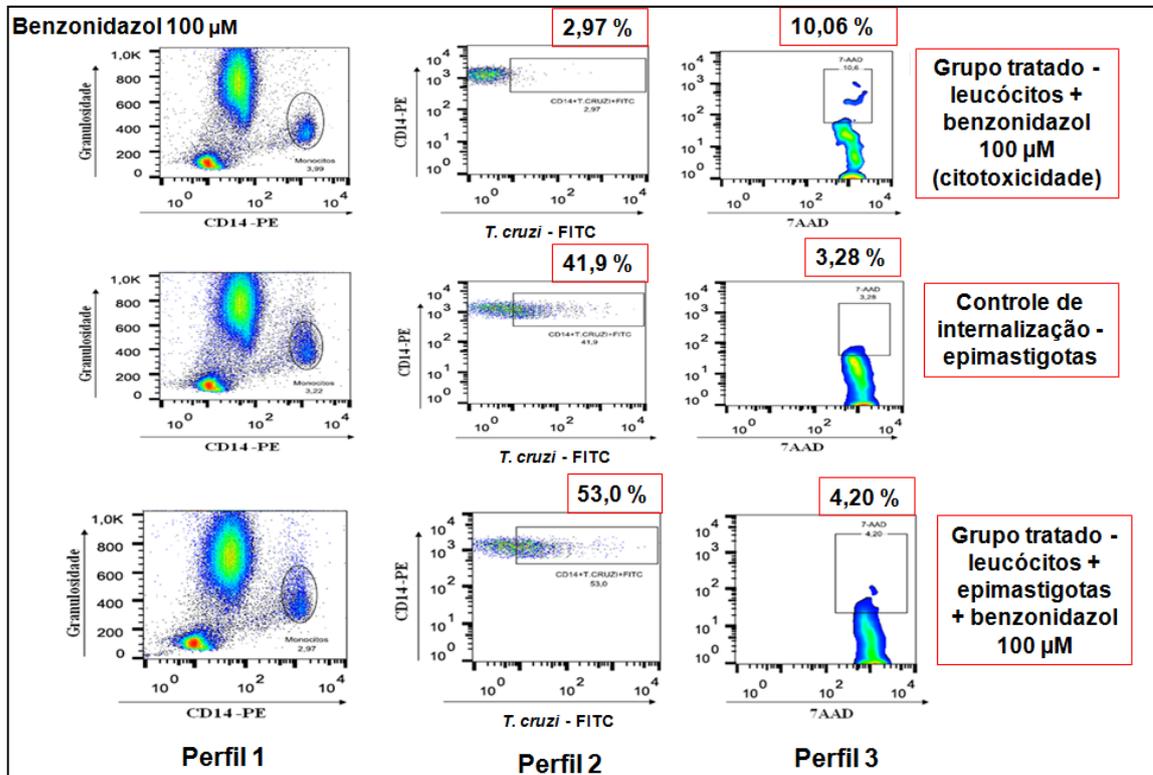
### **6.3 Efeito dos fármacos benzonidazol, ravuconazol e posaconazol na internalização de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano e na viabilidade celular**

Para confirmar a aplicabilidade do novo ensaio funcional para prospecção de novos compostos com atividade tripanossomicida e sua citotoxicidade, foi utilizado o benzonidazol que é um fármaco de uso clínico para o tratamento da doença de Chagas. Além disso, para padronizar a aplicabilidade do novo ensaio funcional, os fármacos antimicóticos, ravuconazol e posaconazol foram também utilizados. Por se tratar de um método multiparamétrico foram avaliados, simultaneamente, o impacto destes fármacos na taxa de internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* marcadas com FITC por monócitos do sangue periférico humano e na viabilidade celular através do marcador 7-AAD.

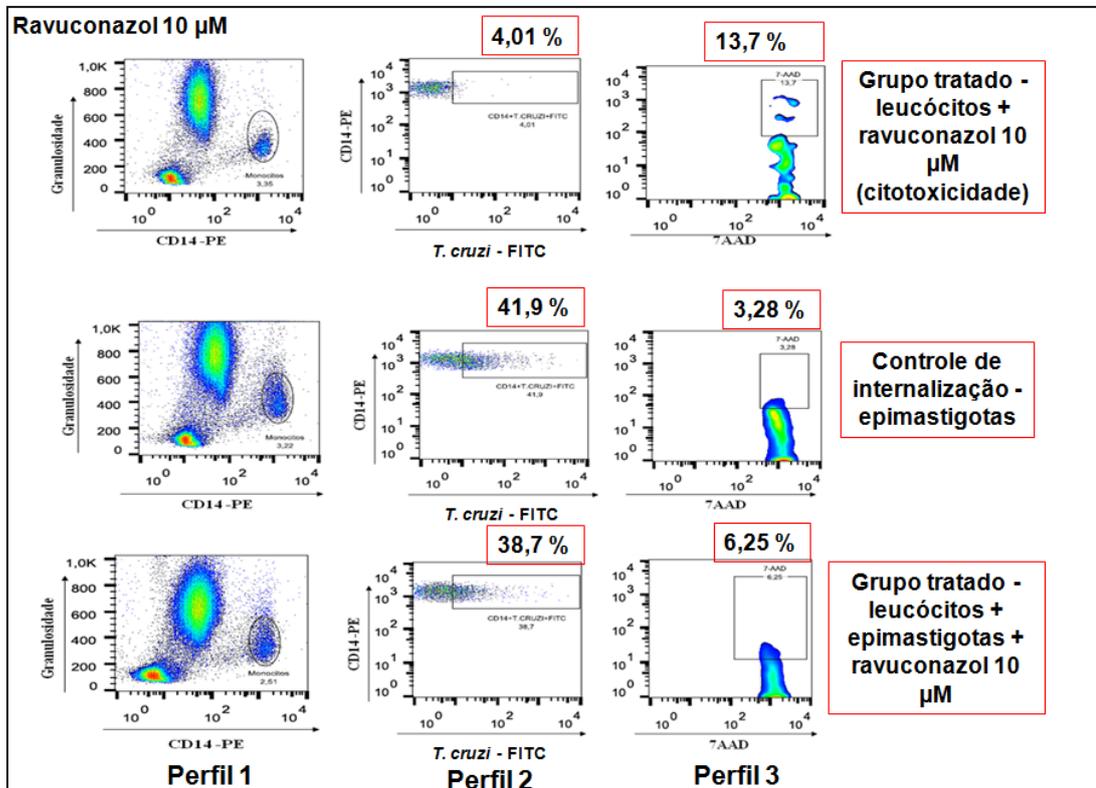
Para a etapa de análise da internalização dos parasitos com os diferentes fármacos, foi realizado um ensaio preliminar para determinar a concentração de menor toxicidade induzindo morte celular dos monócitos do sangue periférico humano, por quantificação de células 7-AAD<sup>+</sup>. As concentrações desses compostos que não causaram morte celular significativa foram determinadas sendo benzonidazol 100 µM, ravuconazol 10 µM e posaconazol 100 µM.

Foi realizada a análise do efeito dos fármacos benzonidazol (Figura 6), ravuconazol (Figura 7) e posaconazol (Figura 8) na internalização de epimastigotas do *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano, bem como sua citotoxicidade para monócitos do sangue periférico usando o composto 7-AAD. Os gráficos apresentados são representativos das análises realizadas para delimitar a população de monócitos em gráficos de densidade de FL2/CD14-PE versus granulosidade. Seleccionada a população de monócitos, gráficos de densidade de FL1/*T.cruzi*-FITC versus FL2/CD14-PE foram utilizados para a análise do percentual da população de monócitos internalizando as formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com FITC. A partir da seleção de monócitos, foi construído também um histograma representativo da quantificação de monócitos 7-AAD<sup>+</sup> por FL3/7-AAD em função do número de eventos, representando as células não viáveis. É importante enfatizar que os controles de células incubados somente com o meio de cultura, apresentaram o perfil semelhante ao

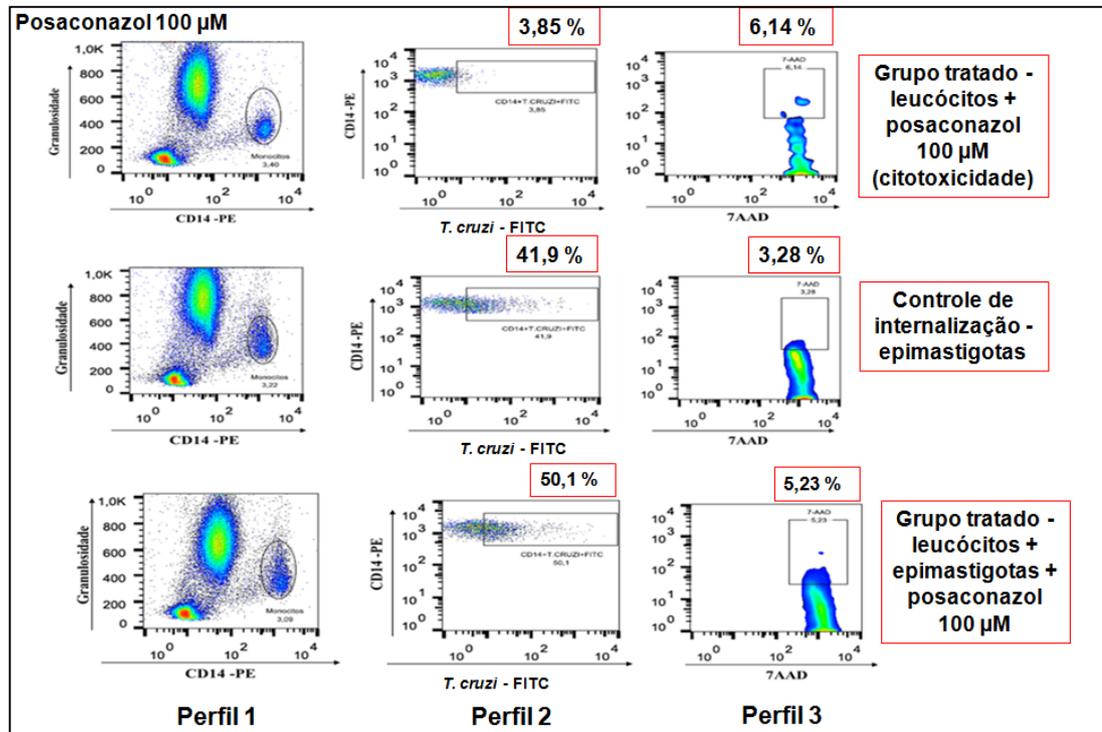
tratamento das células com os diferentes fármacos e não foram apresentados, já que não houve citotoxicidade celular significativa.



**FIGURA 6:** Perfil representativo do efeito do benzimidazol na internalização de epimastigotas de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano de um voluntário saudável. Perfil 1: seleção da população de monócitos por meio de gráfico de densidade de fluorescência 2 (FL2/CD14-PE) versus granulosidade, representando o controle de células na presença do benzimidazol 100 µM (ausência de epimastigotas). Perfil 2: análise da população de monócitos na presença de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com FITC em gráfico de densidade de fluorescência 1 (FL-1/*T. cruzi*-FITC) versus FL2/CD14-PE, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) em destaque, o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito marcado em gráfico de densidade de FL1/*T. cruzi*-FITC versus FL2/CD14-PE. Perfil 3: quantificação de células 7-AAD<sup>+</sup> na população de monócitos em gráficos de densidade de fluorescência 3 (FL3/7-AAD) versus FL2/CD14-PE, indicando na seleção retangular a porcentagem de monócitos não viáveis. No controle de leucócitos consideramos o corte de 4%.



**FIGURA 7:** Perfil representativo do efeito do ravuconazol na internalização de epimastigotas de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano de um voluntário saudável. Perfil 1: seleção da população de monócitos por meio de gráfico de densidade de fluorescência 2 (FL2/CD14-PE) versus granulosidade, representando o controle de células na presença do ravuconazol 10  $\mu\text{M}$  (ausência de epimastigotas). Perfil 2: análise da população de monócitos na presença de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com FITC em gráfico de densidade de fluorescência 1 (FL-1/*T. cruzi*-FITC) versus FL2/CD14-PE, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) em destaque, o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito marcado em gráfico de densidade de FL1/*T. cruzi*-FITC versus FL2/CD14-PE. Perfil 3: quantificação de células 7-AAD<sup>+</sup> na população de monócitos em gráficos de densidade de fluorescência 3 (FL3/7-AAD) versus FL2/CD14-PE, indicando na seleção retangular a porcentagem de monócitos não viáveis. No controle de leucócitos consideramos o corte de 4%.

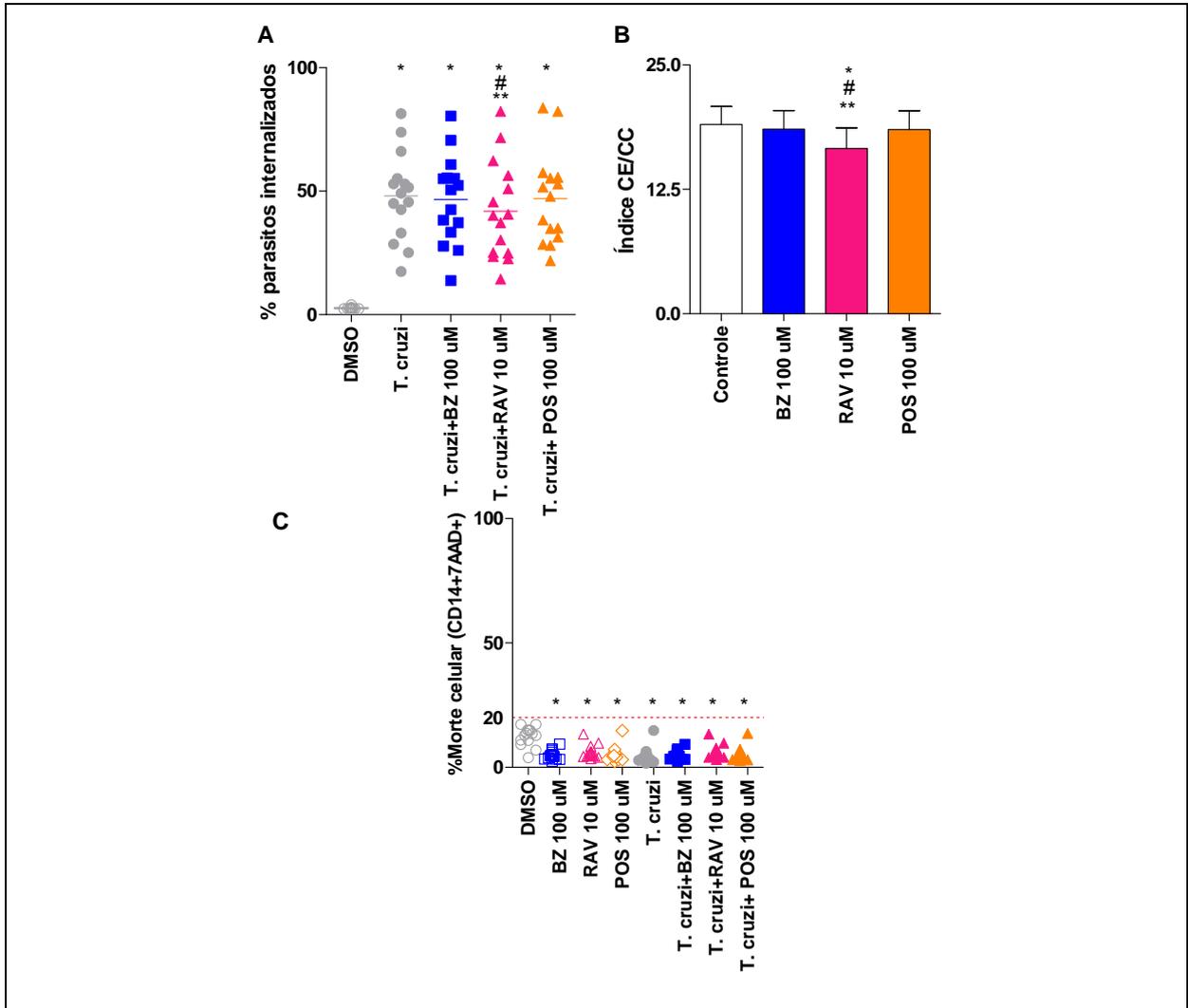


**FIGURA 8:** Perfil representativo do efeito do posaconazol na internalização de epimastigotas de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano de um voluntário saudável. Perfil 1: seleção da população de monócitos por meio de gráfico de densidade de fluorescência 2 (FL2/CD14-PE) versus granulosidade, representando o controle de células na presença do posaconazol 100 µM (ausência de epimastigotas). Perfil 2: análise da população de monócitos na presença de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com FITC em gráfico de densidade de fluorescência 1 (FL-1/*T. cruzi*-FITC) versus FL2/CD14-PE, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) em destaque, o percentual de monócitos que fagocitaram o parasito marcado em gráfico de densidade de FL1/*T. cruzi*-FITC versus FL2/CD14-PE. Perfil 3: quantificação de células 7-AAD<sup>+</sup> na população de monócitos em gráficos de densidade de fluorescência 3 (FL3/7-AAD) versus FL2/CD14-PE, indicando na seleção retangular a porcentagem de monócitos não viáveis. No controle de leucócitos consideramos o corte de 4%.

Nos gráficos abaixo estão compilados os dados das amostras de sangue periférico dos 15 doadores voluntários. Na Figura 9A, os dados estão apresentados em gráfico de dispersão, mostrando a variabilidade individual de cada doador que participou do estudo. Na Figura 9B, os dados são referentes à análise da capacidade de redução de internalização das formas epimastigotas de *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico na presença das drogas testadas. Na Figura 9C, observa-se a porcentagem de células não viáveis marcadas com 7-AAD em amostras tratadas e não tratadas com benzonidazol 100 µM, ravuconazol 10 µM e posaconazol 100 µM.

Os dados mostram uma grande variação no percentual de internalização dos parasitos por monócitos do sangue periférico dos diferentes doadores com uma porcentagem média de internalização de 48,04 %. (Figura 9A). Os resultados mostraram que a porcentagem média de parasitos internalizados pelos monócitos dos diferentes voluntários tratados com benzonidazol e posaconazol foi semelhante ao controle célula e parasito não tratado (Figura 9B). Esses dados revelam que essas duas drogas não apresentaram redução na internalização dos parasitos por monócitos. Os dados também estão apresentados pela forma de índice da cultura exposta (CE) versus a cultura controle (CC) multiplicado por 100. Os resultados demonstraram uma diminuição do índice de internalização na presença de ravuconazol, quando comparado ao índice na ausência de fármacos e na presença de benzonidazol e posaconazol (Figura 9B), mostrando que o ravuconazol mostrou-se ativo contra o *T. cruzi*. As demais análises não demonstraram nenhuma diferença significativa na presença dos demais fármacos empregados (Figura 9B).

A análise da porcentagem de células não viáveis marcadas com 7-AAD demonstrou que para todas as situações estudadas, a porcentagem se manteve abaixo de 20%, que é o valor máximo de morte celular estipulado para o ensaio preditivo (Figura 9C). Além disso, a porcentagem de morte celular na presença de solução de DMSO era significativamente maior, embora dentro dos valores de 20%, quando comparada as demais combinações avaliadas (Figura 9C).



**FIGURA 9:** Avaliação da internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* por monócitos do sangue periférico humano dos voluntários avaliados, na ausência (controle) ou presença dos fármacos benzonidazol (BZ – 100  $\mu$ M), ravuconazol (RAV – 10  $\mu$ M) e posaconazol (POS – 100  $\mu$ M) no ensaio preditivo. Leucócitos do sangue total (n=15 doadores) foram incubados com os diferentes fármacos por 6 horas. (A) Gráfico de dispersão com os dados de porcentagem de internalização de parasitos de todos os doadores (n=15). (B) Gráfico de análise do índice da capacidade de redução de internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* (razão cultura exposta-CE por cultura controle-CC x 100) por monócitos do sangue periférico. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão apresentadas por (\*), (#) e (\*\*) para destacar diferenças existentes entre o tratamento com ravuconazol e a cultura controle, na presença de benzonidazol e posaconazol, respectivamente. (C) Gráfico de citotoxicidade celular representa a porcentagem de células inviáveis que incorporaram o composto 7-AAD (7-aminoactinomicina D) em relação ao tratamento com os diferentes fármacos. As diferenças estatisticamente significativas entre as situações testadas e a cultura controle com DMSO estão representadas por (\*). O limiar de 20% de positividade é o critério adotado como aceitável para o percentual de morte celular durante o ensaio preditivo.

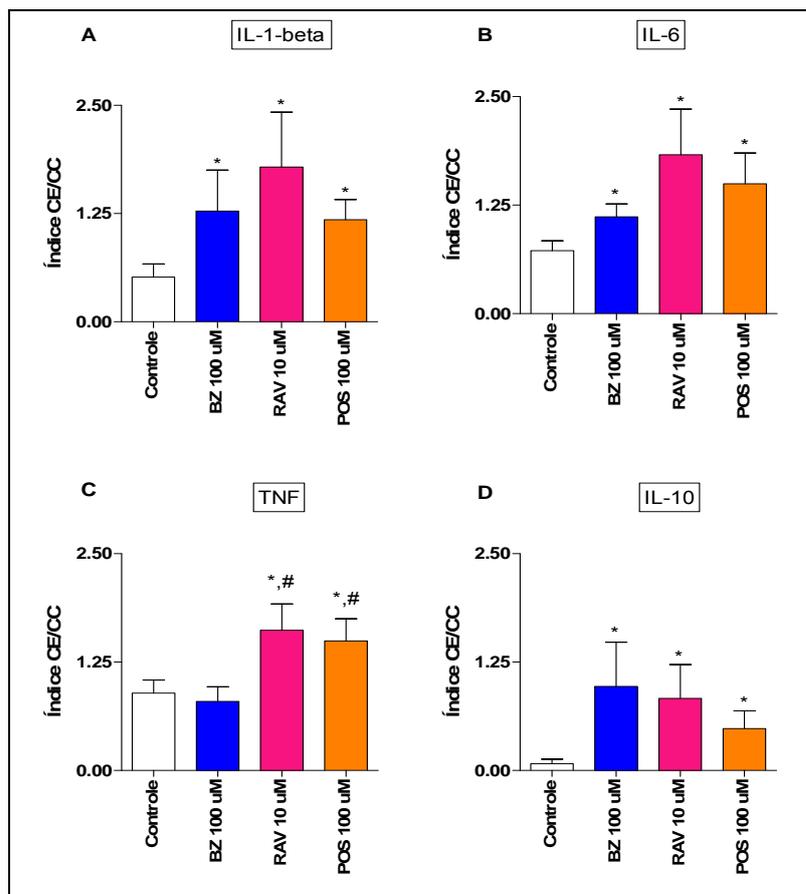
#### **6.4 Potencial imunomodulador do benzonidazol, ravuconazol e posaconazol na produção de citocinas e quimiocinas no sobrenadantes de culturas de curta duração de leucócitos do sangue periférico humano**

Os leucócitos do sangue periférico dos 15 voluntários saudáveis participantes do estudo foram incubados durante 6h com as formas epimastigotas vivas do *T. cruzi* marcadas com FITC na ausência ou presença de benzonidazol, ravuconazol e posaconazol e o sobrenadante das culturas foi utilizado para avaliação da atividade imunomoduladora dos fármacos utilizando o novo ensaio preditivo, que emprega a citometria de fluxo. Em virtude de se avaliar o perfil imune em culturas de curta duração, optou-se por analisar citocinas e quimiocinas que teriam um papel significativo nos eventos iniciais de interação células do hospedeiro/parasitos/drogas. Em nosso estudo dosamos as citocinas (IL 17, INF- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, IL-1- $\beta$ , IL-12 P70) e quimiocinas (CCL2, CCL5, IL-8/CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10) que são liberadas em resposta a imunidade inata, estímulo primário a um patógeno. Contudo, não conseguimos quantificar as citocinas (IL 17, INF- $\gamma$ , IL-4, IL-2 e IL-12 P70) e quimiocinas (CXCL-9 e CXCL-10), pois elas apresentaram valores indetectáveis no ensaio de CBA. Esse resultado pode ser provavelmente devido à baixa quantidade dessas moléculas no sobrenadante das culturas, uma vez que o tempo de incubação de 6h não foi suficiente para a expressão dessas proteínas. Dessa forma, foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1- $\beta$ , IL-6, TNF e a citocina moduladora IL-10, bem como as quimiocinas CCL2, CCL5 e CXCL8. Em relação à citocina TNF, a metodologia utilizada detecta ambas isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ .

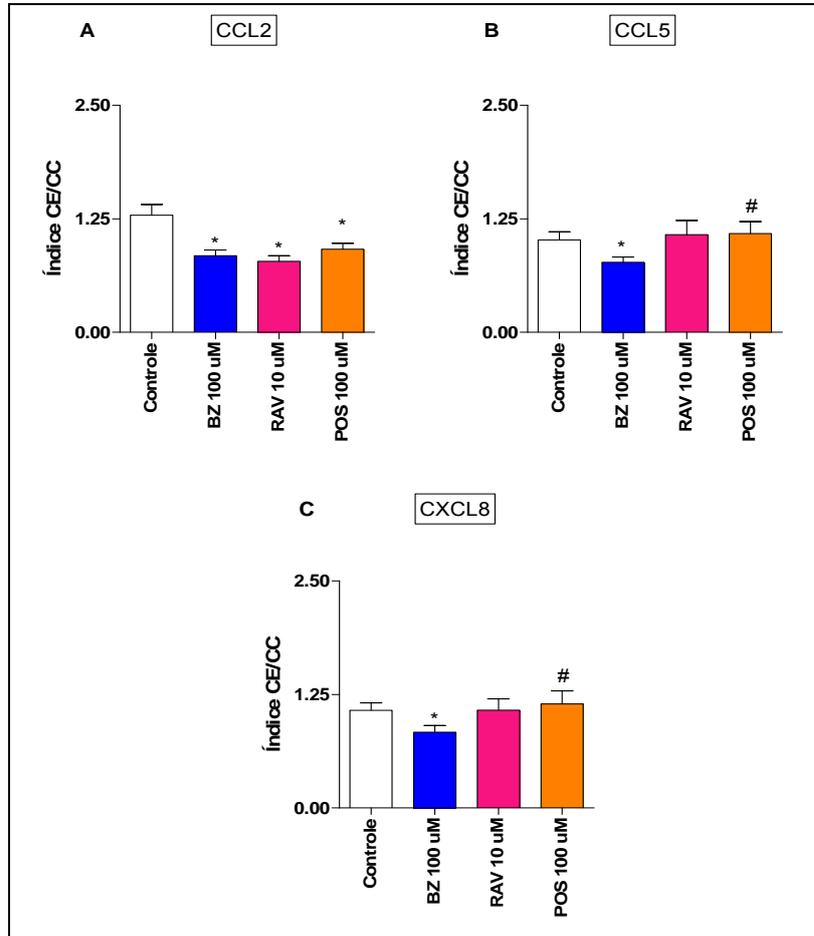
Os dados de citocinas revelaram um aumento dos índices de IL-1- $\beta$ , IL-6 e IL-10 nas culturas com presença de todos os fármacos, benzonidazol, ravuconazol e posaconazol, quando comparado à cultura controle na ausência dos fármacos (Figura 10 A,B,C). Além disso, o índice TNF estava aumentado nas culturas na presença de ravuconazol e posaconazol, quando comparado às culturas na ausência de fármacos e na presença de benzonidazol (Figura 10C).

Na análise do perfil de quimiocinas (Figura 11), de forma oposta ao observado para as citocinas, os resultados revelaram diminuição do índice de CCL2 nas culturas em presença de benzonidazol, ravuconazol e posaconazol, bem como uma diminuição do índice de CCL5 nas culturas com benzonidazol, quando comparado à cultura na ausência de fármacos (Figura 11A). Além disso, a análise do índice de CCL5 também demonstrou um aumento dos valores na presença de posaconazol em comparação com as culturas na presença de benzonidazol

(Figura 11B). Perfil semelhante de índice aquele apresentado por CCL5 foi também apresentado por CXCL8, onde houve uma diminuição do seu índice na presença de benzonidazol em comparação com a cultura controle na ausência de fármacos e um aumento do índice de CXCL8 na presença de posaconazol, quando comparado às culturas com benzonidazol (Figura 11C).



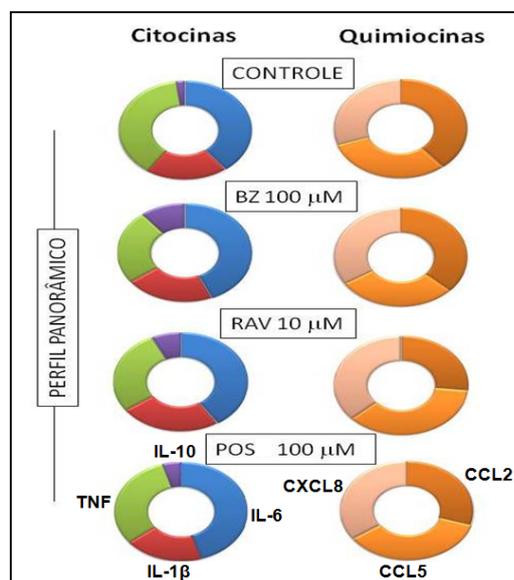
**FIGURA 10:** Perfil de citocinas no sobrenadante de culturas de curta duração de sangue total. Leucócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=15) foram expostos *in vitro* por 6h com formas epimastigotas vivas do *T. cruzi* na ausência (Controle= □) ou presença de benzonidazol 100 µM (BZ= ■), ravuconazol 10 µM (RAV= ■) e posaconazol 100 µM (POS= ■). Foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1-beta, IL-6, TNF e a citocina imunomoduladora IL-10. As concentrações dos analitos foram determinadas em pg/mL. Os resultados estão expressos em gráficos de barras como índice (cultura exposta – CE/cultura controle – CC) sob a forma de média ± erro padrão. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao grupo controle e grupo BZ estão assinaladas por (\*) e (#), respectivamente.



**FIGURA 11:** Perfil de quimiocinas no sobrenadante de culturas de curta duração de sangue total. Leucócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=15) foram expostas *in vitro* por 6h com formas epimastigotas vivas do *T. cruzi* na ausência (Controle= □) ou presença dos benzonidazol 100 μM (BZ= ■), ravuconazol 10 μM (RAV= ■) e posaconazol 100 μM (POS= ■). Foram avaliadas as quimiocinas CCL2, CCL5 e CXCL8. As concentrações dos analitos foram determinadas em pg/mL. Os resultados estão expressos em gráficos de barras como índice (cultura exposta – CE/cultura controle – CC) sob a forma de média ± erro padrão. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle e grupo BZ estão assinaladas por (\*) e (#), respectivamente.

Para que pudéssemos ter uma visão mais geral da atividade imunomoduladora apresentada pelos fármacos avaliados, foi apresentado um perfil panorâmico das citocinas e quimiocinas, de acordo com a proporção que mantinham em consonância com as variabilidades metodológicas propostas pelo ensaio preditivo (Figura 12). De forma geral, os dados demonstraram que as citocinas IL-10 e TNF são aquelas que apresentaram maior impacto após a adição dos fármacos, destacando-se em ordem decrescente de magnitude uma maior proporção de IL-10 na presença de benzonidazol, ravuconazol e posaconazol que

associa-se de forma inversa com a proporção de TNF, nessas mesmas condições (Figura 12 - lado esquerdo). Por outro lado, no que se refere às quimiocinas, alterações nas proporções estão mais evidentes para as quimiocinas do tipo C-C, CCL2 e CCL5, que apresentaram proporções ligeiramente alteradas na presença de ravuconazol e posaconazol, havendo uma diminuição de CCL2 e aumento de CCL5 em comparação ao perfil apresentado na ausência de fármacos e na presença de benzonidazol. A quimiocina CXCL8 mantém proporções mais constantes ao longo do ensaio preditivo que independem da presença dos fármacos (Figura 12 - lado direito).



**FIGURA 12:** Perfil panorâmico de citocinas e quimiocinas em culturas de curta duração de sangue total. Leucócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=15) foram estimulados *in vitro* por 6h com formas epimastigotas vivas do *T. cruzi* na ausência (Controle) ou presença de benzonidazol 100 µM (BZ), ravuconazol 10 µM (RAV) e posaconazol 100 µM (POS). Foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1-beta (■), IL-6 (■) e TNF (■) e a citocina moduladora IL-10 (■), bem como as quimiocinas CCL2 (■), CCL5 (■) e CXCL8 (■). As concentrações dos analitos foram determinadas em pg/mL, sendo calculadas as proporções existentes entre as citocinas e quimiocinas, respectivamente. Os resultados estão expressos em gráficos de rodas como percentual de citocinas e quimiocinas apresentado por cada grupo do estudo.

## 7 DISCUSSÃO

A proposta desta dissertação foi desenvolver um ensaio preditivo funcional e multiparamétrico por citometria de fluxo, utilizando como modelo leucócitos do sangue periférico humano, incubados em presença de formas epimastigotas de *T. cruzi*, a fim de se avaliar o potencial de compostos potencialmente anti-*T. cruzi*. Neste ensaio quantitativo, parâmetros como internalização do parasito, bem como toxicidade (imunotoxicidade) e resposta imune podem ser avaliados simultaneamente em uma mesma amostra teste, o que representa um salto em inovação metodológica para ensaios preditivos. Para padronizar esse ensaio, foram utilizados fármacos como o benzonidazol, primeira escolha no tratamento da doença de Chagas, bem como o ravuconazol e o posaconazol, fármacos potenciais em investigação para o tratamento da doença.

A proposta para o uso desta metodologia é utilizada como ensaio preditivo/confirmatório (para uma triagem secundária, após identificação de compostos bioativos em ensaios convencionais), de compostos em potencial para seguirem no fluxograma de desenvolvimento de um novo quimioterápico para doença de Chagas. Nesta racional, a substância/extrato bruto de melhor atividade antiparasitária, avaliada pela redução de parasitos fagocitados e menor toxicidade neste ensaio poderá ser selecionada entre seus pares para os posteriores estudos *in vivo* ou fracionamento químico.

No processo de desenvolvimento de um fármaco, milhares de compostos são avaliados nas várias etapas de ensaios *in vitro*, para prever eficácia (efeito desejado no modelo de doença estudado) e toxicidade (efeito indesejado em células saudáveis). Um programa típico para descoberta de novos fármacos consiste de uma série de atividades e começa com o desenvolvimento de ensaios biológicos a serem usados para identificação das moléculas ativas no alvo escolhido, dentro de um modelo de doença. Vários são os modelos *in vitro* usados para prever toxicidade nos diferentes sistemas como cardiotoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade aguda e crônica, além dos parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica (Kim, 2010).

Um dos maiores desafios enfrentados pela indústria farmacêutica é o fracasso de candidatos promissores a novos medicamentos, devido aos efeitos adversos imprevistos que são identificados durante estudos de segurança pré-clínicos em animais e ensaios clínicos. O

desenvolvimento de ensaios *in vitro* com capacidade de prever com precisão os efeitos adversos *in vivo* permitiria a seleção de compostos com perfis de alto risco de toxicidade, de forma a não serem priorizados, enquanto aqueles que possuem os atributos necessários para um fármaco com um perfil de menor risco possam progredir no fluxograma de desenvolvimento. O novo paradigma na descoberta de medicamentos deve incluir um meio robusto de identificar questões relacionadas com a toxicidade no início do processo de descoberta, onde o custo no início do processo é menor do que em fases posteriores. Desta forma, os ensaios *in vitro* têm a perspectiva de que possam refletir com confiança os eventos observados *in vivo*. Assim, ensaios multiparamétricos podem fornecer importantes pistas sobre os potenciais efeitos indesejados *in vivo*. Os dados de toxicidade são parte das informações utilizadas para selecionar candidatos para seguir nas outras etapas do desenvolvimento (Kim, 2010).

Ademais, o uso de um método com maior acurácia durante a fase de seleção de compostos promissores *in vitro* também contribui para a redução do uso de animais para os estudos *in vivo*, já que nos protocolos para a avaliação da atividade anti-*T. cruzi in vivo*, serão utilizados menos 10 animais para cada substância a ser avaliada. Neste contexto, após triagem em ensaios convencionais, como o ensaio com  $\beta$ -galactosidase realizado pela plataforma PLABIO Tc-PDTIS/FIOCRUZ, os compostos que apresentam atividade tripanocida são testados em células L929 para determinação da citotoxicidade (Romanha *et al*; 2010). Os compostos que apresentam índice de seletividade maior ou igual a 50 (razão do  $IC_{50}$  da droga na célula pelo  $IC_{50}$  parasito) são submetidos ao teste de atividade *in vitro*. Inicialmente é avaliada a citotoxicidade aguda dos camundongos, seguida pelo ensaio de redução da parasitemia e posteriormente pelo ensaio de avaliação de cura (Romanha *et al*; 2010). Diferente do novo método proposto nesse estudo, no método convencional não se tem informação sobre a imunotoxicidade ou impacto do composto na produção de citocinas, que é um importante parâmetro nesta doença. A avaliação desses aspectos da atividade imunomoduladora dos compostos é muito importante antes de se fazer uma avaliação de atividade *in vivo*, podendo assim obter informações mais precisas sobre o composto, diminuir o uso de animais de experimentação e o custo das pesquisas (Bandeira *et al*; 2012).

Pelos dados apresentados neste trabalho, o ensaio multiparamétrico permite a avaliação simultânea do percentual de parasitos internalizados em presença ou não dos fármacos, bem como fazer inferências da citotoxicidade de novas entidades químicas avaliadas, além de se avaliar seu efeito em parâmetros importantes da resposta imunológica como citocinas e quimiocinas. Este método permite a caracterização do efeito antiparasitário e citotóxico, bem

como imunotóxico, em um ensaio de maior complexidade, cujos parâmetros são avaliados simultaneamente, sendo ainda de maior sensibilidade e quantitativo. Não há relatos na literatura de um método multiparamétrico usando monócitos do sangue periférico humano para análise de prospecção de potenciais fármacos para tratamento da doença de Chagas.

No presente protocolo inédito, foi utilizado o sangue periférico de 15 voluntários saudáveis que foi incubado por 6 horas na presença/ausência de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com fluoresceína, na ausência/presença dos fármacos tripanomicidas (benzonidazol 100  $\mu$ M, ravuconazol 10  $\mu$ M e posaconazol 100  $\mu$ M). Utilizamos as formas epimastigotas do parasito, devido à facilidade de cultivo e pelo grande número de parasitos obtidos. No início dos experimentos utilizamos as formas tripomastigotas, entretanto tivemos vários problemas de obtenção com baixo número de tripomastigotas e presença de formas amastigotas contaminantes nas preparações. Diante disso, optamos por usar em nossos experimentos as formas epimastigotas.

Nos ensaios de fagocitose, como esperado, houve variação nas porcentagens de internalização de formas epimastigotas de *T. cruzi*, variando de doador para doador. Esta variação está associada às individualidade/particularidades do sistema imune inerentes a cada indivíduo, conforme descrito por Dalanhol e colaboradores (2010). É interessante ressaltar que essa mesma variação de fagocitose entre amostras de sangue periférico foi observada em ensaios empregando formas promastigotas vivas de *Leishmania* spp (Bandeira *et al*; 2012). É interessante ressaltar que dados da literatura sobre a capacidade de interação e infecção celular mostram que o *T. cruzi* demora mais tempo para ser internalizado quando comparado com *Leishmania*, que é internalizada em apenas 5 minutos em contato com a célula fagocítica. Já o *T. cruzi* tem mecanismos de interação mais complexos e inúmeras moléculas de superfície celular que fazem com que a sua internalização demore cerca de 30 minutos (Barros, *et al*; 2012). Similar ao ensaio descrito por Bandeira *et al.* (2012), também utilizamos em nossos ensaios o tempo de 6h de incubação. A incubação dos monócitos por 12 ou 24 h promoveu grande porcentagem de morte celular que foi acima do aceitável (20%), então definimos o tempo de incubação de 6h.

O único medicamento aprovado para uso para doença de Chagas no Brasil é o benzonidazol. Nesta dissertação foi utilizado o benzonidazol, e também o ravuconazol e posaconazol, novos compostos triazólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol considerados como fármacos potenciais para uso no tratamento da doença de Chagas.

O *T. cruzi* para manter a viabilidade e proliferação celular em todas as fases do seu ciclo de vida, precisa do ergosterol, por isso a importância de se testar esses fármacos. Os inibidores da biossíntese de ergosterol foram testados por terem demonstrado em estudos anteriores a capacidade de induzir a cura parasitológica nos estágios agudos e crônicos da doença de Chagas (Molina *et al*; 2000; Urbina *et al*; 2000; Urbina, 2010). Esses fármacos, cujas atividades anti-*T. cruzi* e citotoxicidade contra o parasito já foram demonstrados em métodos convencionais *in vitro* foram usados para padronização desta metodologia e demonstram que a mesma permite prever os mesmos resultados observados *in vitro* e em estudos experimentais *in vivo* usando modelo murino.

Em 2012, Bandeira e colaboradores padronizaram esta nova metodologia multiparamétrica para ser utilizada em ensaios *in vitro* de avaliação do potencial leishmanicida de novas entidades químicas. As condições estabelecidas por estes autores foram similares as utilizadas no estudo atual, sendo alterado o parasito para o *T. cruzi* e direcionado para ser utilizado no processo de seleção de substâncias promissoras úteis no desenvolvimento de fármacos para doença de Chagas. No ensaio, os autores demonstraram que o tratamento de leucócitos incubados com *L. braziliensis* com fármacos como anfotericina e glucantime levaram a uma redução do percentual de parasitos fagocitados, semelhantemente ao observado nos ensaios convencionais usando linhagens estabelecidas e ensaios colorimétricos. Os autores demonstraram ainda, de forma quantitativa, não somente os efeitos de redução de fagocitose por monócitos para os referidos fármacos, bem como seu efeito citotóxico, sendo utilizado o 7-AAD, que tem sido empregado em vários estudos para verificar a viabilidade celular nos experimentos *in vitro* por meio da citometria de fluxo (Lecoeur *et al*; 1997; Tait *et al*; 1999). Nossos resultados mostraram que os leucócitos na presença de *T. cruzi*, apresentavam uma menor porcentagem de morte celular (7-AAD) quando comparado com essas mesmas células na ausência de parasito. Parece que o *T. cruzi* protege as células da morte celular. Outros estudos precisam ser realizados para validar essa observação.

Quanto à avaliação da atividade fagocítica por monócitos do sangue periférico humano, no presente estudo foi observado uma diminuição da internalização de formas epimastigotas do *T. cruzi* frente ao ravuconazol (Figura 7), mostrando que o ravuconazol foi ativo contra o *T. cruzi*. Estudos prévios mostraram uma excelente atividade *in vitro* e *in vivo* do ravuconazol na infecção pelo *T. cruzi* murina, com 70% de cura na fase aguda da infecção (Urbina, 2003). A variação do percentual de monócitos do sangue periférico internalizando o *T. cruzi* após tratamento com ravuconazol foi de 14,36 a 82,33 (média de 41,84), em comparação à cultura

controle 2,35 a 4,93. Na presença de benzonidazol foi de 13,8 a 80,43 (média de 46,61) e com o posaconazol foi de 21,8 a 83,69 (média de 46,95).

Estudos realizados por Murta e colaboradores (1999) e Lages-Silva e colaboradores (1990) demonstraram uma cooperação da quimioterapia específica da doença de Chagas e o sistema imune do hospedeiro. Lages-Silva e colaboradores observaram que a fagocitose e a destruição intracelular de tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, coletados de camundongos tratados com benzonidazol, era significativamente aumentada quando comparada com parasitos obtidos de animais não tratados. Murta e colaboradores (1999), observaram que o benzonidazol age nos parasitos da cepa Y do *T. cruzi* aumentando a fagocitose e a produção das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e NO por esplenócitos de camundongos, favorecendo assim, a destruição dos parasitos intracelulares pelo compartimento celular do sistema imune. Nos dados encontrados pelo ensaio preditivo atual, não foi observado um aumento da internalização de parasitos frente ao benzonidazol, como demonstrado *in vitro* por Murta e colaboradores (1999). Cabe ressaltar, que os experimentos publicados na época, foram realizados por microscopia óptica e contagem dos parasitos internalizados por macrófagos murinos. Esses ensaios apresentam sensibilidade significativamente distinta daquela apresentada pelo ensaio preditivo atual.

Uma das vantagens desta inovação multiparamétrica seria permitir a análise simultânea de parâmetros de viabilidade, fagocitose e imunomodulação farmacológica (estimulação ou supressão da resposta imune). Um componente importante de resistência ou resposta efetiva do hospedeiro contra protozoários está intimamente relacionado com sua imunidade, que é um elemento complementar fundamental ao longo do tratamento contra doenças provocadas por esse grupo de patógenos. Estudos prévios realizados por nosso grupo demonstraram que uma resposta imune pró-inflamatória mediada por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é relevante para potencializar a atividade de drogas anti-*T. cruzi*, levando a uma intervenção terapêutica efetiva (Sathler-Avelar *et al*; 2006; Sathler-Avelar *et al*; 2008). Apesar do grande número de estudos sobre a resposta imune após a infecção por *T. cruzi*, existem relativamente poucos trabalhos sobre o impacto do tratamento nesta resposta. Foi demonstrado previamente que o tratamento com benzonidazol induz células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup> a produzirem IFN-  $\gamma$  e que IL-10 produzida por células T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B são, supostamente, elementos-chave na modulação da resposta imune e de controle de danos teciduais induzidos pela resposta pró-inflamatória (Sathler-Avelar *et al*; 2006; Sathler-Avelar *et al*; 2008). Além disso, após o fim desta terapia, ocorre uma redução substancial do número de interações entre diferentes marcadores. Entretanto, a produção de IL-

10 é preservada, o que sugere que esta molécula possa ser capaz de modular a imunidade protetora (Campi-Azevedo *et al*; 2015).

Como um referencial por estudos prévios publicados no tema, pode-se dizer que uma droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deveria estar associada com o estabelecimento de uma resposta pró-inflamatória, modulada por IL-10, para promover uma terapia de sucesso sem efeitos colaterais graves. Os resultados de atividade imunomoduladora encontrados durante o ensaio preditivo corroboram essa afirmativa e sugerem que os fármacos testados seriam capazes de induzir um perfil em leucócitos de indivíduos saudáveis compatível com aquele associado à eficácia terapêutica na doença de Chagas (Figuras 10 e 11). Nesse contexto, o ensaio preditivo padronizado nesta dissertação tem ampla abrangência e importância, uma vez que também nos permite avaliar o perfil imunomodulador das drogas testadas, pela quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante das culturas.

Em suma, pode-se afirmar que o ensaio preditivo inovador proposto pelo estudo pode ser futuramente uma ferramenta útil como um ensaio confirmatório para seleção de amostras mais promissoras, identificadas em programas de prospecção de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

## 8 CONCLUSÃO

O novo ensaio preditivo padronizado nesta dissertação permite avaliar simultaneamente o percentual de internalização das formas epimastigotas do *T. cruzi* pelos leucócitos do sangue periférico expostos aos diferentes fármacos, bem como avaliar a viabilidade/citotoxicidade celular dos leucócitos na presença dos fármacos testados e analisar a atividade imunomoduladora desses fármacos, pela quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante das culturas.

## 9 PERSPECTIVAS

- A padronização desse novo ensaio preditivo mostrou ser bom método de triagem de compostos, diante disto podemos avaliar a atividade biológica de extratos vegetais e substâncias que tem se mostrado ativas contra o parasito;
- Realizar essa metodologia utilizando amostras de sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas;
- Complementar o ensaio preditivo pela análise da dosagem de citocinas intracitoplasmáticas por diferentes subpopulações de leucócitos do sangue periférico;
- Fazer associações entre fármacos já utilizados para o tratamento da doença de Chagas e também novos compostos que apresentem atividade contra o parasito.

## REFERÊNCIAS

- Bandeira C; *et al.* Padronização de ensaio funcional pré-clínico multiparamétrico *in vitro* por citometria de fluxo para avaliar potenciais atividades leishmanicidas e citotóxica de substâncias puras e produtos naturais. Dissertação de mestrado, 2012.
- Bastos VD. Laboratórios farmacêuticos oficiais e doenças negligenciadas: perspectivas de política pública. *Rev BNDES*. 13(25):269-98, 2006.
- Barros; *et al.* Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium spp*. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 13, nº. 20, p. 01-134, 2012.
- Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug toxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *J Infectious Diseases* 172(4): 1157-9, 1995.
- Bolzani VS. Biodiversidade e bioprospecção como estratégias para a descoberta de drogas a partir de plantas e fungos endofíticos – a experiência do Biota-FAPES. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 1 a 3 de dezembro de 2004.
- Borges, A. Papel do polimorfismo de genes envolvidos no controle da resposta imune na susceptibilidade à Doença de Chagas. Dissertação de mestrado, Uberaba, Outubro de 2013.
- Brener Z, Andrade Z.A; Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 431 p, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 114:103-110, 1997.
- Buckner F, Yokoyama K, Lockman J, Aikenhead K, Ohkanda J, Sadilek M, Sebti S, Van Voorhis W, Hamilton A, Gelb MH. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15149-15153, 2003.
- Buckner FS, Flamme Ac, Van V. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 40: No. 11; pp: 2592-2597; 1996.
- Buscaglia, C.A; *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*, v. 4, p. 229-36, 2006.
- Campi-Azevedo, AC. *et al.* Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. *Immunobiology*, v. 220, n. 5, p. 564-74, May 2015.
- Canavacci, AMC, Bustamante JM, Padilla AM, Cecilia M, Brandan P, Simpson LJ., Dan Xu, Boehlke CL, Tarleton RL. *In Vitro* and *In Vivo* High-Throughput Assays for the Testing of Anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds *PLoS Negl Trop*, 4(7): e 740, 2010.

Cañado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(suppl.1): 331-335, 1999.

Carfi; M, Gennari; A, Malerba ;I, Corsini ;E, Pallardy ;M, Pieters ;R. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: A preliminary study. *Toxicology*, 229, 11–22, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention CDC. Ciclo da doença de Chagas, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Chagas C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotripanum cruzi*; n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1: 1-59, 1909.

Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol.Screen* 20 (1), 22–35, 2015.

Coder MD. Current Protocols in Cytometry: Assessment of Viability, Immunofluorescence, and DNA Content; *John Wiley and Sons, Inc.* Unit 9.2; 9.2.1-9.2.14; 1997.

Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 3-24, 2002.

Coura JR, Perreira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memória Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(6), September 2011.

Cunha-filho M, Barreto L, Leonardi D, Lamas M, Claudio S. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. *Brasília Med*. 49(4):279-283, 2012.

Dacie, Lewis. *Practical Haematology*, 11th Edition, Churchill Livingstone, 2012.

Dalanhol M; *et al.* Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.32 no.1 São Paulo Feb e pub Mar 19; 2010.*

Dias LC, Desso MA. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quím Nova*. 32:2444-57, 2009.

Díaz DE, Toranzo EG, Castro JA, Franke DE, Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 44: 880-881, 1988.

Dutra W O, ROCHA MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* Dec;21(12):581-7. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5:727–743, 2005.

Falconnet D; *et al.* Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays - Review Article. *Biomaterials*, Volume 27, Issue 16, Pages 3044-3063, June 2006.

Ferreira M.S, Lopes E.R., Chapadeiro E, Dias; JCP, Ostermayer A.L. Doença de Chagas. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2ª Edição Ed. Atheneu, 38p, 2002.

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews Immunology*, v.6, p.895-906, 2006.

Gomes JA, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar D, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Silvestre KF, Batista MA, Schachnik NC, Correa-Oliveira R, Eloi-Santos S, Martins-Filho OA. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology*. Oct;217(10):1005-16; 2012 ; pub: Jan 20; 2012.

Guido, RVC, Andricopulo AD, Oliva G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. av. vol.24, n.70, pp. 81-98; 2010.*

Inoue A.; *et al.* Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T Lymph Node Th/Th-2 proportion. *Biol Pharm. Bull*, 25(4):536-540; 2002.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, Mccurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 48, p. 348-357, 1993.

Kim JM. Building a Tiered Approach to In Vitro Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with In Vivo Relevance. *Comb Chem High Throughput Screen*; 13(2): 188–206, 2010.

Lages-Silva E, Filardi LS, Brener Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 85:401-405, 1990.

Langezaal I; *et al.* Whole blood cytokine response as a measure of immunotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 15: 313–318; 2001.

Lecoeur, Eric L, Marie-Christine P, Marie-Lise G. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *Journal of Immunological Methods* 209: 111–12;1997.

Miranda C; *et al.* A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 152, 8–16, 2015.

Molina J, Brener Z, Romanha AJ, Urbina JA. In vivo activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Antim Chemother.* 46: 137-140, 2000.

Moncayo A, Silveira. AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. 1), 17–30, 2009.

Moraes CB; *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific Reports* 4, Article number: 4703, 2014.

- Morillo; *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The new england journal of medicine*. vol. 373 n°. 14, 2015.
- Murta SMF, Robert C, T, Alves RO, Gazinelli RT, Romanha A& A. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunology*, 21:535–54, 1999.
- Organização Pan- Americana de Saúde/ Organização Mundial de saúde - Opas/OMS Brasil, 2011. Disponível em: [http://www1.paho.org/bra/images/stories/AtualizarDocs/organizacao%20do%20trabalho\\_atualizacao\\_%202011-2012.pdf?ua=1](http://www1.paho.org/bra/images/stories/AtualizarDocs/organizacao%20do%20trabalho_atualizacao_%202011-2012.pdf?ua=1)
- Pontes F. Doenças negligenciadas ainda matam 1 milhão por ano no mundo. *Rev Inovação em Pauta*. 6:69-73, 2009.
- Rassi A, Luquetti AO. Therapy of Chagas Disease, p. 237-247. In S Wendel, Z Brener, ME Camargo, A Rassi, (eds). *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT (International Society of Blood Transfusion), São Paulo, 1992.
- Rassi A, Rassi JÁ, Rassi GG. Fase Aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Org.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª. ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. p 231-245, 2000.
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. Apr 24;(50); 2011.
- Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy, 2007.
- Romanha AJ, Castro SL, Soeiro MN et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:233-238, 2010.
- Sathler-avelar R. *et al.* Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol*, v. 64, n. 5, p. 554-63, 2006.
- Sathler-avelar R. *et al.* Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect*, v. 10, n. 2, p. 103-13, Feb 2008.
- Sathler-avelar R. *et al.* Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display na overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *trypanosoma cruzi* antigens. *BMC Infectious Diseases*. 12:123, 2012.
- Sereno; *et al.* DNA Transformation of *Leishmania infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45: 1168-1173, 2001.

Soeiro MNC, Dailyri A, Silva CF, Batista DGJ, Souza EM, Oliveira GM, Salomão K, Batista MM, Pacheco M, Silva PB, Santa-Rita RM, Menna-Barreto RFS, Boykin DW, De Castro SL. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions through in vivo and in vitro studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 301-310, 2009.

Souza PE; *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*, v. 72, n. 9, p. 5283-91, Sep. 2004.

Souza PE; *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*, v. 75, n. 4, p. 1886-94, Apr. 2007.

Tait JF, Smith C, Wood BL. Measurement of Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes and Platelets by Whole-Blood Flow Cytometry with Annexin V. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 25 (5): Setembro 15: 271-278, 1999.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon SA, Morri SLM, Wittner M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v.5, p.400-419, 1992.

Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fedn. Proc.* 32:1870-4, 1973.

Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gurtler RE. The challenges of Chagas disease - grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med* 4: 2007.

Thakur, CP. *et al.* Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. v.93, n.3, p.319-323, 1999.

Thurm CW, Halsey JF. Measurement of cytokine production using whole blood. *Curr Protoc Immunol.*, 7 (7). 2005.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501, 2003.

Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartrolí J. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother* 44: 2498-2502, 2000.

Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Dis* 9: 287-295, 2002.

Urbina JA. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 349-355, 1999.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 115(1-2):55-68, 2010.

Vespa GNR, Cunha FQ, Silva J.R. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun*, v. 62, p. 5177-82, 1994.

Villela MM, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 25(4):907-17, 2009.

Vitelli-Avelar DM; *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol*, 68:516–525, 2008.

Wagner J. Assays for immunomodulation ad effects on mediators of inflammation. In: Hostettmann K, Assay for Bioactivity. Academic Press, San Diego, p195-217, 1991.

Zhang, L.; Tarleton, R. L. Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas Disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486, 1999.

Zingales *et al.* A new consensus for trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends tcl to tcVI. *Memórias Inst. Oswaldo cruz*. Vol.104 nº.7. Rio de janeiro, 2009.