



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos
na infecção por *Trypanosoma cruzi***

Gisele Bulhões Portapilla

Ribeirão Preto
2019



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos
na infecção por *Trypanosoma cruzi***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia

Orientada: Gisele Bulhões Portapilla

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Versão corrigida da Tese de Doutorado e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 18/06/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto /USP.

Ribeirão Preto
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Portapilla, Gisele Bulhões

Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2019

89 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia.

Orientador: de Albuquerque, Sérgio.

1. Fenotiazínicos. 2. Atividade biológica. 3. *Trypanosoma cruzi*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gisele Bulhões Portapilla

Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Lourival e Regina** com imensa gratidão por todo amor dedicado à nossa família e incentivo aos estudos. A meu **esposo Henrique** pela paciência e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela forte presença em minha vida. Obrigada pelas graças e oportunidades concedidas. *“Porquanto o Senhor teu Deus é Deus misericordioso, e não te desampará, nem te destruirá, nem se esquecerá da aliança que jurou a teus pais”* (Deuteronômio 4:31).

Ao meus pais, **Lourival e Regina**. Nada que eu escreva pode representar a importância de vocês na minha vida. Sou privilegiada por ter nascido em um berço repleto de amor e carinho. Obrigada por todos os sacrifícios devotados à nossa família e pela forte presença em todas as fases da minha vida. Agradeço a minha **mãe**, pelo amor incondicional. Obrigada pelo incentivo e direcionamento sobre a importância dos estudos. Ao meu **pai**, por ser um exemplo de humildade, bondade e do verdadeiro amor paterno. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs **Ariane e Valéria**, pela amizade e companheirismo. Agradeço pela paciência para ouvir minhas lamúrias e por todos os conselhos. Ao meu sobrinho, **Víctor**, por trazer mais alegria e felicidade ao nosso lar. Agradeço ainda, a toda minha família repleta de pessoas boas e compreensivas. Amo vocês!

Ao meu amor, meu amigo e esposo **Henrique**, por incentivar e apoiar todos os meus planos e decisões. Sou e serei sempre grata a Deus por ter ao meu lado um homem generoso, bondoso e amável. Quero caminhar sempre ao seu lado, segurando sua mão, ouvindo sua voz e precisando do seu abraço e colo nos dias de tormenta. Te amo hoje mais do que ontem!

Ao **Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque**, pela orientação, confiança em meu trabalho. Palavras não são suficientes para agradecer todas as oportunidades concedidas após esses sete anos de orientação. Certamente, a minha trajetória na pós-graduação trouxe um grande amadurecimento profissional e pessoal. Gratidão!

À minha amiga **Inara Fernanda Lage Gallo**. Não tenho palavras para descrever todo meu amor você. Sempre digo que Deus nos colocou no mesmo caminho em um momento que mais precisaríamos uma da outra. Agradeço imensamente pela amizade, pela companhia, por ouvir minhas lamentações e pelas palavras de incentivo. Certamente, você tornou e torna minha jornada mais fácil e repleta de amor e carinho. Te amo!

À minha amiga querida **Maiara Voltarelli Providello**. Muito obrigada pela importante participação e dedicação a esse trabalho. Agradeço ainda pela amizade, companheirismo e pela confiança em meu trabalho. A sua presença no laboratório e na minha vida, sem dúvida alguma, me ajudou a ser uma pessoa mais forte e confiante. Obrigada pelo olhar de ternura, pelo carinho e por todas as palavras de incentivo. Adoro você!

Às joias preciosas que Deus colocou em meu caminho, **Pedro Sampaio, Amanda Goulart e Naira Anchieta**. Meu coração enche de alegria por poder chamar vocês de amigos. Tenho orgulho de vocês, que independente das adversidades da vida e momentos difíceis que passaram, mantiveram o coração afável e generoso. Obrigada por me ajudarem na materialização desse trabalho, pelas aulas de imunologia e pela amizade. Nessa jornada vocês foram colo e paz para meu coração. Adoro vocês!

Aos meus amigos queridos **Luiz Miguel Pereira, Mariana Bronzon**. Todo meu respeito e admiração pela contribuição de vocês a ciência. Sou privilegiada de tê-los como amigos.

Obrigada Luiz Miguel pela paciência e disponibilidade para me ajudar nos experimentos do doutorado. Você é humilde e tem um grande coração! A você Mariana, agradeço imensamente pela amizade, por ter sido meu alicerce durante muitos momentos do doutorado e pelo seu coração generoso. Te adoro muito! Agradeço também pelos momentos de descontração, pelo riso gratuito e pelas palavras de carinho. Gratidão eterna por toda dedicação de vocês na reta final do meu doutorado!

Em especial, agradeço a **Nádia Noronha**, minha amiga querida, pela amizade que começou na graduação, mas que resiste mesmo aos problemas e adversidades da vida. Obrigada pela paciência, pelo carinho e pela sincera amizade!

A minha amiga **Regina Aguenta**, pelos momentos de descontração, pela amizade, carinho e por tornar minha vivência em Ribeirão mais tranquila e feliz.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, **Cristiana Gonzalez** e **Georgius Luiz de Oliveira** pelo auxílio e ajuda durante os experimentos realizados no laboratório.

Ao funcionário da FCFRP-USP **Henrique Theodoro** por ser sempre solícito e amável com todos os alunos da pós-graduação. A todos os funcionários e docentes da FCFRP-USP, que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional.

Aos camundongos que involuntariamente contribuíram para a realização deste trabalho. De maneira geral, agradeço a todos os animais que são fundamentais no desenvolvimento da ciência no Brasil e no mundo. *“No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender”* (Mahatma Gandhi)

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, processo nº 141011/ 2018-1, pela bolsa concedida. Ao CNPq e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-001)** pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

GRATIDÃO!

"N3o vai demorar que passemos adiante
uma grande e bela ci4ncia, que faz arte em
defesa da vida." (Carlos Chagas)

RESUMO

PORTAPILLA, G. B. **Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos na infecção por *Trypanosoma cruzi***. 2019. 90f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Estima-se que cerca de sete milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, inclusive residentes de países não endêmicos. O benznidazol é o fármaco de escolha para tratamento da doença, mas ele causa severos efeitos colaterais e apresentam baixa eficácia em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica avançada. Nas últimas décadas, milhares de substâncias têm sido estudadas na prospecção de novas substâncias ativas contra *Trypanosoma cruzi*. Nesse contexto, os corantes fenotiazínicos representam uma classe de substâncias de alto potencial terapêutico, especialmente o fenotiazínico azul de metileno, que tem sido usado o tratamento da malária e estudado contra outros protozoários, como *Leishmania sp* e *Trypanosoma cruzi*. Portanto, o objetivo desse trabalho foi determinar o potencial tripanocida de corantes fenotiazínicos, combinados ou não ao benznidazol, em protocolos para tratamento *in vitro* e *in vivo* de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Os corantes comerciais (azul de metileno (MB), novo azul de metileno (NMB), azul de toluidina (TBO) e 1,9 dimetil azul de metileno (DMMB) e quatro sintéticos não comerciais (DO15, DO16, DO37 e DO43), foram avaliados, combinados ou não ao benznidazol, em protocolos *in vitro*. No estudo *in vitro*, a atividade tóxica das substâncias foi determinada em células de mamíferos e o ensaio tripanocida, avaliado contra as formas amastigotas da cepa Tulahuen. As substâncias MB e DMMB, combinados ou não ao BZ, foram selecionados para o estudo em animais experimentalmente infectados (cepa Y) durante a fase aguda da infecção. O efeito biológico do tratamento foi monitorado pela parasitemia no sangue de camundongos, seguido de quantificação do DNA parasitário no tecido cardíaco pelo método de qPCR e contagem de ninhos de amastigotas em cortes histológicos. Outras ferramentas de estudo incluíram: determinação de parâmetros bioquímicos (ALT e AST) e análise imunomoduladora em timo e baço dos camundongos. NMB e DMMB inibiram as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em concentrações menores que 100nM. Esse efeito foi potencializado e sinérgico quando ambos foram combinados a TBO nos estudos *in vitro*. Em contrapartida, animais experimentalmente infectados demonstraram um aumento da parasitemia após tratamento com MB, BZ+DMMB, MB+DMMB. Na maioria dos métodos avaliados, esses grupos demonstram maior carga parasitária quando comparado com o controle infectado, principalmente BZ+DMMB e MB+DMMB. O aumento da carga parasitária pelo tratamento com MB+DMMB parece estar ligado ao maior recrutamento de células específicas do sistema imune para o local de infecção ou bloqueio de funções importantes do sistema imunológico, uma vez que a atrofia do timo, aumento das populações T duplo negativas e T CD8⁺ estão aumentadas nesse grupo. Da mesma maneira células dendríticas e macrófagos que são células especializadas na fagocitose e reconhecimento de antígenos foram significativamente aumentadas após tratamento com MB+DMMB. Embora os resultados desse trabalho sugerem uma baixa atividade dos fenotiazínicos no estudo *in vivo*, o potencial *in vitro* deve despertar estudos futuros sobre o entendimento da falha terapêutica *in vivo*, principalmente porque MB é um medicamento utilizado em seres humanos, apresenta baixo custo e toxicidade. Estudos futuros devem ser encorajados para contribuir no desenvolvimento de terapias alternativas para tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: 1. Fenotiazínicos. 2. Atividade biológica. 3. *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

PORTAPILLA, G. B. *In vitro* and *in vivo* determination of trypanocidal effect of phenothiazine dyes on *Trypanosoma cruzi* infection. 2019. 90f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

About seven million people are infected with *Trypanosoma cruzi* worldwide, including residents of non-endemic countries. Benznidazole is a therapy choice for treatment of the disease, but it causes severe side effects and have low efficacy in patients with advanced chronic Chagas cardiomyopathy. In the last decades, thousands of substances have been studied in the prospection of new active substances against *Trypanosoma cruzi*. In this context, phenothiazine dyes represent a class of substances of high therapeutic potential, especially the methylene blue phenothiazine, which has been used to treat malaria and investigated against other parasites such as *Leishmania* sp and *Trypanosoma cruzi*. Therefore, the aim of this work was to determine the trypanocidal potential of phenothiazine dyes, combined or not with benznidazole, from *in vitro* and *in vivo* treatment protocols on *Trypanosoma cruzi* infection. Commercial dyes (methylene blue (MB), new methylene blue (NMB), toluidine blue (TBO) and 1.9-dimethyl methylene blue (DMMB) and four non-commercial dyes (DO15, DO16, DO37 and DO43). The toxicity of the substances was determined in mammalian cells and trypanocidal assay was performed against the amastigote forms of the Tulahuén strain. MB and DMMB, combined or not BZ, were selected for the study in experimentally infected animals (strain Y) during the acute phase of infection. The biological effect of the treatment was monitored by parasitemia in the blood of mice, followed by quantification of the parasitic DNA in the cardiac tissue by the qPCR method. Other tools included: determination of biochemical parameters (ALT and AST) and immunomodulatory analysis in thymus and spleen of mice. NMB and DMMB inhibited the amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* at concentrations less than 100 nM. This effect was potentiated and synergistic when both were combined in the *in vitro* studies. In contrast, experimentally infected animals demonstrated an increase in parasitaemia after treatment with MB, BZ + DMMB, MB+DMMB. In most of the evaluated methods, these groups show higher parasitic load when compared to the infected control, mainly BZ+DMMB and MB + DMMB. The increase in parasite burden by treatment with MB+DMMB appears to be linked to recruitment of specific cells of the immune system to infection site or it may block some important functions of the immune system, since thymic atrophy, increased T double populations negative and CD8⁺ T are increased in this group. In the same way dendritic cells and macrophages that are specialized cells in phagocytosis and antigen recognition were significantly increased after treatment with MB+DMMB. Although the results of this work suggest a low activity of the phenothiazines in the *in vivo* study, the *in vitro* potential should awaken future studies on the understanding of the therapeutic failure *in vivo*, mainly because MB is a medicine used in humans, presents low cost and toxicity. Future studies should be encouraged to contribute to the development of alternative therapies for the treatment of Chagas' disease.

Keywords: 1. Phenothiazines. 2. Biological activity. 3. *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* simplificado 20
- Figura 2.** Estrutura química do Nifurtimox e Benznidazol 25
- Figura 3.** Estrutura química do fenotiazínico 28
- Figura 4.** Mecanismo de ação de MB como substrato no ciclo-redox da GR de *P. falciparum* 29
- Figura 5.** Estrutura química de fenotiazínicos 33
- Figura 6.** Representação do ciclo de amplificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* por qPCR 41
- Figura 7.** Efeito tripanocida das combinações entre Benznidazol e corantes fenotiazínicos. 47
- Figura 8. Evolução da parasitemia de camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com benznidazol, azul de metileno e 1,9-dimetil-azul de metileno, isoladamente ou em combinação.** A parasitemia foi avaliada no sangue periférico de camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no 5º, 7º, 9º, 11º após a infecção. A figura 8.A representa a parasitemia dos grupos avaliados no decurso da experimentação. Os gráficos para cada dia foram mostrados individualmente em 8.B; 8.C; 8.D e 8.E. (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB; (ns) não significativo.. Os resultados do presente trabalho foram avaliados por testes estatísticos com auxílio do software *GraphPad Prism*, com análise da média e erro padrão dos dados obtidos. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico One Way ANOVA post hoc Tukey ($p < 0.05$). 50
- Figura 9. Ganho de peso dos animais em experimentação na fase aguda da infecção.** Os dados do peso de cada animal foram obtidos no primeiro e último (pré-morte) dia após a infecção e a diferença entre o peso final e inicial, corresponde ao valor do ganho de peso de cada grupo após dez dias de tratamento. Na figura foram demonstrados média ± EPM do ganho de peso de cada grupo ($n=5$ /grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$). 52
- Figura 10. Quantificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostra de tecido cardíaco.** Na figura foram demonstrados a média ± EPM da quantificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostra de tecido cardíaco dos animais de cada grupo em experimentação ($n=5$ /grupo) (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB (◆) grupos estatisticamente diferentes de DMMB; (@) grupos estatisticamente diferentes de BZ+MB Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$). 53
- Figura 11. Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco.** Na figura foram demonstrados a Média ± EPM da contagem de ninhos de amastigotas de três secções cardíacas para cada animal dos grupos em experimentação ($n=5$ /grupo). (∇) grupos estatisticamente

diferentes de BZ10. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$)..... 54

Figura 12. Análise histopatológica do tecido cardíaco. Fotomicrografia representativa da secção cardíaca de cada grupo. Setas pretas indicam ninhos de amastigotas e setas verdes apontam para o infiltrado de células inflamatórias. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB..... 55

Figura 13. Quantificação plasmática dos níveis de AST, ALT. Na figura foram demonstrados média \pm EPM da dosagem dos parâmetros bioquímicos hepáticos para cada animal dos grupos em experimentação ($n=5$ /grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10;(ns) não significativo. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$). 57

Figura 14. Peso do timo dos animais em experimentação. Na figura foram demonstrados média \pm EPM do peso do timo de cada animal dos grupos em experimentação ($n=5$ /grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (\$) grupos estatisticamente diferentes de BZ100; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (@) grupos estatisticamente diferentes de BZ+MB Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$)..... 58

Figura 15. Análise fenotípica das populações celulares no timo por citometria de fluxo. Aquisição da população de linfócitos de acordo com as características de complexidade e expressão de CD3, D4 e CD8; (A) a (I), Imagem representativa das subpopulações de linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J a M) Média \pm SEM da frequência das populações parentais de linfócitos entre os animais de cada grupo em experimentação ($n=5$ /grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (\$) grupos estatisticamente diferentes de BZ100; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB; (◆) grupos estatisticamente diferentes de DMMB; (@) grupos estatisticamente diferentes de BZ+MB; Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$)..... 59

Figura 16. Análise fenotípica das populações de linfócitos no baço por citometria de fluxo. Aquisição das populações do baço de acordo com as características de complexidade e expressão CD3, D4 e CD8; (A) a (I) Imagem representativa das subpopulações de linfócito CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de um animal de cada grupo. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J e K) Média \pm SEM da frequência das populações parentais de linfócitos entre os animais de cada grupo em experimentação ($n=5$ /grupo). Os dados representados pela letra (a) são estatisticamente diferentes de (b). Os resultados para cada grupo experimental foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$). 61

Figura 17. Análise fenotípica das populações de macrófagos no baço por citometria de fluxo. Aquisição das populações do baço de acordo com as características de complexidade e expressão MHCII e F4/80; (A) a (I) Imagem representativa das subpopulações de macrófago

MHCII⁺F4/80⁺ de um animal de cada grupo. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J) Média ± SEM da frequência das populações parentais macrófagos entre os animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo). (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* (p< 0.05)..... 63

Figura 18. Análise fenotípica das populações de células dendríticas no baço por citometria de fluxo. Aquisição das populações do baço de acordo com as características de complexidade e expressão MHCII e CD11c; (A) a (I) Imagem representativa das subpopulações de células dendríticas MHCII⁺CD11c⁺ de um animal de cada grupo. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J) Média ± SEM da frequência das populações parentais de células dendríticas entre os animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (\$) grupos estatisticamente diferentes de BZ100. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* (p< 0.05)..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinação de corantes fenotiazínicos e Benznidazol para estudo de efeito sinérgico in vitro.....	35
Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais em acordo com os tratamentos e dose administradas no estudo in vivo	37
Tabela 3. Descrição do número de cópias do material genético de <i>Trypanosoma cruzi</i> em valores de massa e concentração utilizadas na confecção da curva-padrão. ng, nanogramas; pg, picogramas; fg, fentogramas	39
Tabela 4. Primers utilizados na reação de qPCR.	40
Tabela 5. Concentração e volume das amostras aplicadas na placa para a amplificação do material genético de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
Tabela 6. Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem das células tímicas e/ou esplênicas.....	43
Tabela 7. Inibição das formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade sobre as células de mamíferos LLC-MK2. A concentração foi representada em μM . IC50 - concentração inibitória de 50% das formas amastigotas (cepa Tulahuen); CC50 - concentração citotóxica de 50% das células de mamíferos; SI, índice de seletividade representado pela razão de CC50 pelo IC50; MB, azul de metileno; NNM, novo azul de metileno; TBO, azul de toluidina; DMMB, 1,9-azul de metileno; BZ, benznidazol. Diferenças estatísticas entre os fenotiazínicos e BZ foram determinadas por One Way ANOVA post hoc Dunnett (* representa $p < 0.05$; *** representa $p < 0.001$).	45
Tabela 8. Quantificação do sinergismo para fenotiazínicos e benznidazol contra as formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle sem tratamento. As substâncias isoladas e em combinação foram avaliadas foram avaliadas concomitantemente na mesma placa para o cálculo dos valores de IC50 a partir da interpolação da curva dose-resposta. O IC50 representa a dose da inibição de 50% das formas amastigotas na monoterapia; IC50c, representa o novo cálculo do IC50 após a combinação de dois compostos. A razão de IC50 e IC50c representa a diferença (número de vezes) da concentração necessária de composto (combinado) para atingir o mesmo valor de IC50 da monoterapia. IC, índice de combinação; Valores $<$, $=$, e >1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. Fa, Fração afetada de 50%. Todos os dados foram obtidos a partir do programa CompuSyn	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise da variância
APCs	<i>Antigen-presenting cell</i> (Células apresentadora de antígeno)
AST	Aspartato Aminotransferase
BENEFIT	<i>BENZnidazole Evaluation for Interrupting Trypanossomiases</i>
BZ	Benznidazol
CC50	<i>Half-maximal cytotoxic concentration</i>
CD	Cluster of differentiation (Designação de grupos)
CDs	Células dendríticas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CI	<i>Combination index</i> (Índice de combinação)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPRG	<i>Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMMB	1,9-Dimethyl-Methylene Blue (1,9-dimetil-azul de metileno)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Duplamente negativas
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DO15	Derivado 15
DO16	Derivado 16
DO37	Derivado 37
DO43	Derivado 43
DP	Duplamente positivas
DP	Desvio Padrão
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FS	Fotossensibilizadores

GR	Glutationa Redutase
H&E	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ifn- γ	Interferon grama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-12	Interleucina 12
LacZ	Operon Lac Z
MB	<i>Methylene blue</i> (Azul de metileno)
MTT	3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NAD(P)H	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)
NFX	Nifurtimox
NH ₂ OH	Radical hidroxilamina
NMB	<i>New Methylene Blue</i> (Novo Azul de metileno)
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido Nítrico)
NO ₂ ⁻	<i>Nitro anion radical</i> (radical nitroânion)
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Anion radical de superóxido
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction quantitative real time</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
T(SH) ₂	Tripanotiona Ditiol
TAE	Tris-Acetato-EDTA,
TBO	<i>Toluidine Blue O</i> (Azul de toluidina O)
TFD	Terapia fotodinâmica
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TR	Tripanotiona Redutase
TS ₂	Tripanotiona Dissulfeto
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de saúde)

SUMARIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Doenças de Chagas	19
1.1.1 Resposta imune e patologia da doença de Chagas	23
1.1.2 Quimioterapia	25
1.2 Fenotiazínicos	27
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Ensaios <i>in vitro</i>	33
3.1.1 Compostos	33
3.1.2 Células e parasitos	34
3.1.3 Atividade biológica contra as formas amastigotas	34
3.1.4 Citotoxicidade em células de mamíferos	34
3.1.5 Atividade sinérgica dos compostos	35
3.2 Ensaios <i>in vivo</i>	36
3.2.1 Animais e parasitos	36
3.2.2 Tratamento	36
3.2.3 Parasitismo sanguíneo	38
3.3 Quantificação do parasitismo do tecido cardíaco por qPCR	38
3.3.1 Extração do DNA	38
3.3.2 Construção de curva-padrão qPCR para quantificação do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
3.3.3 Amplificação das amostras	39
3.4 Análise histopatológica	41

3.5 Parâmetros Bioquímicos	42
3.6 Obtenção e preparo da suspensão de células do baço e timo	42
3.7 Fenotipagem de Leucócitos Por Citometria De Fluxo	42
3.8 Análise Estatística	43
3.9 Aspectos Éticos	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Resultados <i>in vitro</i>	45
4.1.1 Inibição das formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade sobre as células LLC-MK2	45
4.1.2 Determinação da interação sinérgica dos fenotiazínicos e benznidazol contra as formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.2 Resultados <i>in vivo</i>	50
4.2.1 Parasitemia	50
4.2.2 Peso dos animais	52
4.2.3 Análise do Parasitismo tecidual por qPCR	53
4.2.4 Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco	54
4.2.5 Análise das secções do tecido cardíaco por microscopia	55
4.2.6 Avaliação de biomarcadores de função hepática	57
4.2.7 Análise fenotípica das populações celulares no timo por citometria de fluxo ..	58
4.2.8 Análise fenotípica das populações celulares no baço por citometria de fluxo ..	61
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS.....	89
Anexo 1. Documento de aprovação da CEUA.....	89

1. INTRODUÇÃO

A mobilidade humana e eventos epidêmicos sempre estiveram atrelados a história da humanidade. Indígenas que sucumbiram a doenças transmitidas por europeus ou epidemias de cólera, lepra e mais recentemente da gripe A (H1N1) remontam a fragilidade populacional diante das políticas públicas de controle de doenças (BARNETT E WALKER, 2008; VIGNIER E BOUCHAUD, 2018). Atualmente, a mobilização populacional cresce fortalecida pelas várias correntes imigratórias no mundo, seja por pessoas que buscam uma nova oportunidade de emprego ou para aqueles que buscam asilo como consequência de crise econômica e/ou guerras nos países de origem (TROST *et al.*, 2018).

A situação de refugiados abre caminhos para uma discussão ainda maior sobre o impacto de doenças alóctones na economia e saúde dos países anfitriões (DEROSE *et al.*, 2007; DEVILLE *et al.*, 2011). Inúmeros países abrem suas fronteiras em meio a uma discussão polêmica do regime assistencial prestados aos refugiados, que muitas vezes vivem marginalizados e sem acesso a serviços básicos de moradias e saúde (CASTELLI E SULIS, 2017; TROST *et al.*, 2018). Um retrato preocupante é construído, principalmente no que tange a Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN).

As DTN são causadas por diferentes patógenos que prosperam principalmente em regiões pobres de países, cujos sistemas de saúde pública são bastante precários e expõem populações de baixa renda ao risco eminente de infecção (MOLYNEUX *et al.*, 2017). Existem desafios específicos em relação a essas doenças, que exige a conscientização dos países anfitriões para o manejo adequado e controle da infecção (ABBAS *et al.*, 2018; TROST *et al.*, 2018). A negligência aumenta os riscos para a saúde de anfitriões e refugiados em termos de susceptibilidade e disseminação dessas doenças infecciosas (ABBAS *et al.*, 2018).

A introdução de patógenos em novas áreas ou exposição de populações a novas zonas de risco devem ser consideradas pelo menos para a metade das DTNs, incluindo a cólera, tripanossomíase humana africana, esquistossomose, leishmaniose e doença de Chagas (WHO, 2019). A doença de Chagas é uma antropozoonose endêmica em vinte e um países do continente americano, que atualmente apresenta epidemiologia global (WHO, 2019). Estima-se que aproximadamente sete milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, porém milhares delas vivem na Europa, Austrália e Estados Unidos (SORIANO-ARANDES *et al.*, 2016). A migração de pessoas que moravam em áreas de risco, mas que desconheciam ser portadores da doença, foi um fator determinante da disseminação

para países não endêmicos (MOLYNEUX *et al.*, 2017). A falha no diagnóstico e o manejo inadequado da doença, além de características próprias do curso da infecção no hospedeiro, refletem a dificuldade do controle epidemiológico além das fronteiras (COURA E VINAS, 2010). Nesse cenário, a prospecção de terapias alternativas para Doença de Chagas ainda é urgentemente necessária, principalmente para a descoberta de substâncias que possam atuar de maneira efetiva no controle e tratamento dessa doença.

1.1 Doenças de Chagas

Em 22 de abril de 1909, Oswaldo Cruz anunciou à Academia Nacional de Medicina, que o médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1878-1934) identificou o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* como o agente etiológico da doença da Doença de Chagas (COURA, 1997). O processo de descoberta teve início dois anos antes, quando Carlos Chagas viajou a cidade de Lassance (MG) para combater casos de malária entre um grupo de trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil (MONCAYO, 2010)

Como médico e pesquisador, ele coletou alguns insetos que proliferavam intensamente nas frestas das paredes de casas de pau-a-pique e ao examiná-los, identificou um protozoário que chamou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz (MONCAYO, 2010). O médico explorou a capacidade de infecção desse parasito em animais de laboratório e domésticos, mas foi apenas no início de abril de 1909, que ele identificou as formas circulantes no sangue de um ser humano, especificamente em uma menina de três anos chamada Berenice (COURA, 1997). Carlos Chagas foi o único pesquisador na história a descrever todos os aspectos da doença, como as formas evolutivas, ciclo biológico, patogenia, manifestações clínicas e epidemiologia (MONCAYO, 2010).

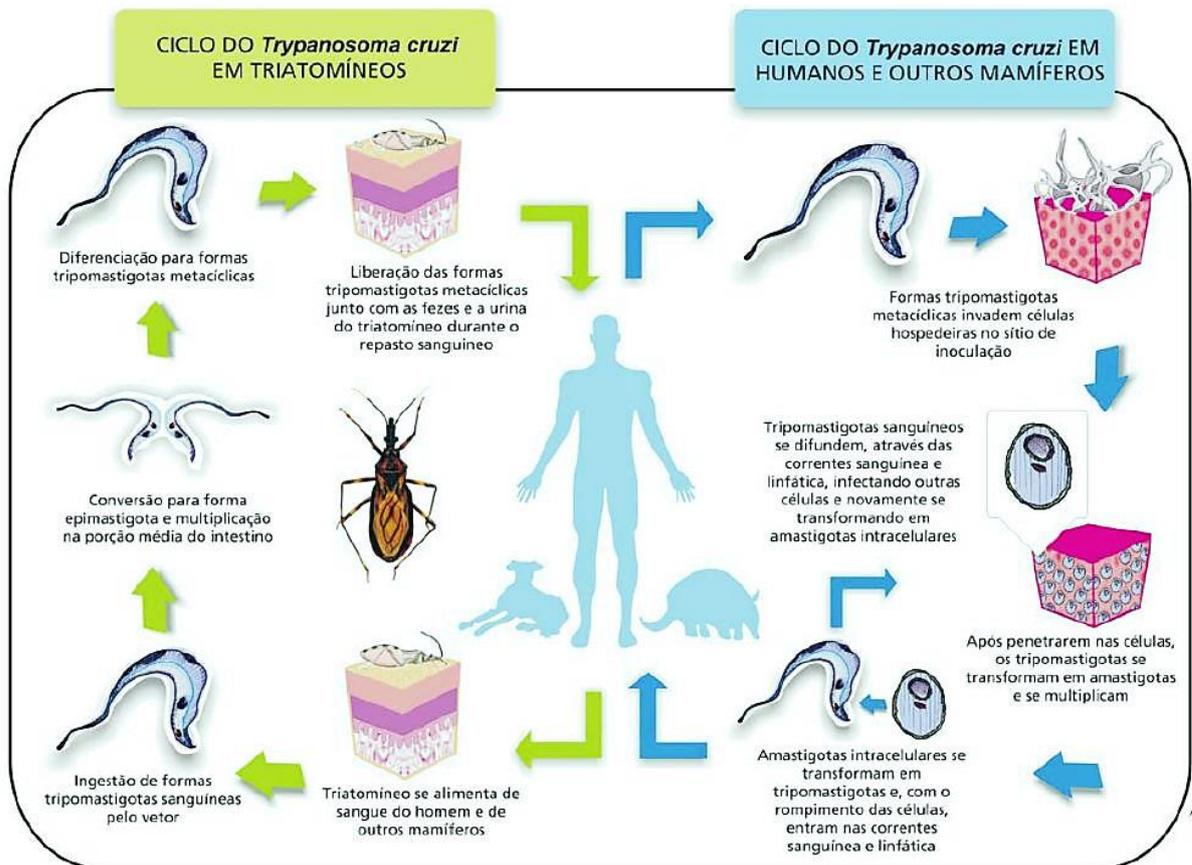
Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado (Família: Trypasonomatidae, Ordem: Kinetoplastida), que possui uma mitocôndria única formada, principalmente por uma rede de DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) extranuclear denominado cinetoplasto (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). A localização do cinetoplasto é sempre próxima ao corpo basal do flagelo, que pode assumir diferentes posições em relação ao núcleo, como consequência das transformações evolutivas que deverá sofrer durante o ciclo de infecção (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012).

O ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* é heteroxênico com passagens por um hospedeiro vertebrado mamífero e um invertebrado pertencente a subfamília Triatominae (MARIN-NETO E RASSI, 2009). O parasito apresenta diferentes estágios de desenvolvimento

que incluem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, presentes no tubo digestivo do inseto vetor, além das formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas presentes no hospedeiro vertebrado (RASSI E MARIN-NETO, 2010).

Sucintamente, o inseto hematófago entra em contato com o sangue de mamíferos infectados e obtêm as formas tripomastigotas sanguíneas que migram para o estômago do inseto, transformando-se em epimastigotas (Figura 1) (CLAYTON, 2010).

Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* simplificado



Fonte: (Venâncio Ribeiro-ICICT Fiocruz)

Essas formas reproduzem-se por fissão binária no intestino médio dos insetos e quando a oferta de nutrientes torna-se escassa, os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicas que migram para a porção final do tubo digestivo no inseto (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012). A infecção de mamíferos ocorre pelo contato com as formas metacíclicas infecciosas eliminadas com as fezes de triatomíneos após o repasto. A

fricção do local pelo hospedeiro vertebrado, contribuem para a entrada do parasito através da solução de continuidade da pele e mucosas (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018).

O tripomastigotas metacíclicos invadem células reticulo-endoteliais do hospedeiro mamífero e tonam-se amastigotas. Essas formas sofrem replicações por fissão binária e ocupam todo o citoplasma celular (RASSI E MARIN-NETO, 2010). Nessa etapa, as formas amastigotas modificam-se em tripomastigotas que rompem a membrana plasmática e se difundem via corrente sanguínea ou linfática para novas células, com maior tropismo por células musculares cardíacas e esqueléticas (TEIXEIRA *et al.*, 2011). O ciclo natural da doença de Chagas torna-se completo quando tripomastigotas sanguíneas são novamente ingeridas por um Triatomíneo (COURA E BORGES-PEREIRA, 2010).

A via vetorial ainda representa o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas (COURA E BORGES-PEREIRA, 2010). Os triatomíneos são naturalmente encontrados em ninhos de aves, tronco de árvores ou tocas de mamíferos, mas muitas espécies podem viver em ambiente peridomiciliares e adaptarem-se a ambientes domiciliares (Perez-Molina e Molina, 2018). Nesse contexto, os marsupiais e roedores têm especial importância epidemiológica, pois apresentam altas taxas de sinantropia para estabelecer uma ligação entre os ciclos silvestre e domiciliar da doença de Chagas (WEALCKX *ET AL.*, 2015; DE FUENTES-VICENTE *et al.*, 2018).

Inicialmente, o *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como “Barbeiro”, foi considerado o principal vetor da doença de Chagas. No entanto, desde 1979 inúmeros esforços entre países do Cone Sul concentraram-se na eliminação deste vetor, o que proporcionou uma redução de aproximadamente 80% da incidência de novas infecções por *Trypanosoma cruzi* em todo o continente (DIAS, 1987). No entanto, outras espécies são capazes de manter o ciclo evolutivo da doença como, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma brasiliensis* (WALECKX *et al.*, 2015). Atenção especial tem sido dada ao inseto adulto *P. geniculatus* que está amplamente distribuído entre países endêmicos e exibe-se como um importante mecanismo subjacente à transmissão da doença de Chagas. Embora essa espécie seja silvestre, ela apresenta alta intrusão doméstica e um forte potencial adaptativo a ambientes domiciliares (LAZZARI *et al.*, 2013; ABAD-FRANCH *et al.*, 2015).

De maneira indireta, os triatomíneos também estão relacionados aos surtos de casos veiculados ao consumo de alimentos ou ingestão de bebidas contaminadas com fezes do triatomíneo infectado (NOBREGA *et al.*, 2009; NOYA *et al.*, 2015). Em 2010, foram notificados casos da doença de Chagas na Venezuela, após o consumo de suco de goiaba contaminado por um grupo de 103 crianças (ALARCON DE NOYA *et al.*, 2010; NOYA *et al.*,

2015). A bacaba e o açaí são outras fontes comuns de contaminação na Região Norte e Nordeste do Brasil, principalmente pelo consumo do alimento *in natura* (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012). Entre 2000 a 2016 foram confirmados mais de dois mil casos de transmissão após consumo de açaí somente no estado do Pará (Brasil) (SANTOS *et al.*, 2018). É importante citar, que outros mecanismos não vetoriais de transmissão incluem a transfusão sanguínea (bancos de sangue sem triagem específica), congênita (principalmente na fase aguda), acidental (acidentes em laboratórios), oral (ingestão de alimentos e bebidas contaminados) e transplantes (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Estima-se que aproximadamente 94% dos imigrantes que vivem com a doença de Chagas em áreas não endêmicas são inconscientes da condição patológica (SCHMUNIS, 2007; BASILE *et al.*, 2011). O desconhecimento e a falha assistencial dos países anfitriões, entre outros fatores, contribuíram para a disseminação da doença, principalmente em bancos de sangue que não possuíam triagem para doenças alóctones (CONNERS *et al.*, 2016). Não é possível fazer a separação de formas tripomastigotas durante a obtenção dos hemocomponentes do sangue e o risco tem sido maior para transfusão de plaquetas, uma vez que a obtenção dessa fração envolve várias etapas de centrifugação (CANCINO-FAURE *et al.*, 2015). Mães infectadas também podem transmitir o parasito para outras gerações durante a gestação ou no processo do parto. A transmissão congênita foi registrada em países não endêmicos como Espanha, Suíça e Suécia. Somente na Espanha foram diagnosticados 32 casos de crianças soropositivas nascidas de mães infectadas que emigraram da Bolívia (CARLIER *et al.*, 2015).

Independentemente da via de transmissão, o curso da infecção no hospedeiro mamífero segue uma fase aguda e crônica (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). A fase aguda ocorre nas primeiras semanas após a inoculação do parasito, que é capaz de infectar qualquer célula nucleada (BONNEY, 2014). Na transmissão vetorial, o hospedeiro pode apresentar uma resposta inflamatória na porta de entrada do parasito, conhecido como chagoma de inoculação ou sinal de Romanã (edema bipalpebral), que são clinicamente perceptíveis pela presença de edema local (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012)

Os tripomastigotas liberados de células infectadas alcançam a corrente sanguínea e linfática para infectar outras células nucleadas em diferentes tecidos do hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 2011). Nesse estágio, a fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia sanguínea e parasitismo tissular difuso, que em pacientes imunocompetentes, regride em um ou dois meses pela ação da resposta imune dirigida ao parasito (BONNEY *et al.*, 2018).

Com a redução das formas tripomastigotas do sangue, inicia-se um período indeterminado da doença, onde a maioria das pessoas permanece sem quaisquer sintomas

clínicos e muitas vezes, desconhecem a presença da infecção chagásica (RASSI JR *et al.*, 2009). Porém, em um período de 10 a 40 anos pós-contágio, parte dos infectados desenvolve uma fase sintomática, representada por patologias no sistema cardiovascular e/ou digestório (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

1.1.1 Resposta imune e patologia da doença de Chagas

Os mecanismos que conferem resistência a infecção chagásica na fase aguda dependem de maneira efetiva da coordenação entre a resposta imune inata e adaptativa (BONNEY *et al.*, 2018). Células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-Presenting Cell*) como macrófagos e células dendríticas (CDs) fornecem a primeira linha de defesa contra a infecção por *Trypanosoma cruzi* (CARDILLO *et al.*, 2015). Receptores na membrana plasmática dessas células, reconhecem padrões moleculares conservados na membrana dos parasitos e induzem o processo de fagocitose ou macropinocitose (ANDRADE *et al.*, 2014). A interação do patógeno e células de defesa, ativam também a liberação de interleucina-12 (IL-12), óxido nítrico (NO) e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor*) pelos macrófagos, que irão recrutar mais células no local de infecção e reduzir os níveis de parasitismo tecidual e sanguíneo (CARDILLO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 2014). A fagocitose é fundamental para o processamento e apresentação de antígeno para linfócitos T *naives* residentes em órgãos linfoides periféricos (CABRAL-PICCIN *et al.*, 2016).

O timo é um órgão linfoide primário responsável pela seleção e proliferação da população de linfócitos T do organismo (BLACKBURN E MANLEY, 2004). Os progenitores de células T surgem na medula óssea e migram para o timo como células imaturas denominados duplamente negativos (DN) por ainda não expressarem moléculas CD4 ou CD8 (LEE *et al.*, 2010). Neste estágio, ocorre uma expansão clonal dos timócitos e rearranjos gênicos, que selecionam e diferenciam essas células a duplamente positivas (DP) CD4 e CD8. Após esse processo, as células DP passam por uma nova seleção para tonarem-se simples positivo (SP) CD4⁺ e CD8⁺, processo que as torna aptas a deixarem o timo e migrarem para órgãos linfoides secundários (BLACKBURN E MANLEY, 2004; RODEWALD, 2008).

As APCs migram para os órgãos linfoides secundários e desempenhar a função de apresentadoras de antígenos aos linfócitos T (ANDRADE *et al.*, 2014). Linfócitos de perfil T CD4⁺ desempenham papel importante na produção de citocinas, como o IFN- γ , responsável por desencadear vias de sinalização que promovem a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, o que confere resistência aos fagócitos (FRESNO E GIRONES, 2018). Além disso,

linfócitos citotóxicos T CD8⁺ também podem ser ativados por APCs e recrutados no local da infecção (DA COSTA *et al.*, 2014; FRESNO E GIRONES, 2018). Linfócitos T CD8⁺ possuem a capacidade de produção e liberação de interferon- γ (IFN- γ) e IL-1 β , além de grânulos, como perforinas e granzimas, que atuam na destruição de células infectadas pelo patógeno, por apoptose, impedindo a disseminação da infecção (SILVERIO *et al.*, 2012)

O ambiente inflamatório é crucial para a resistência do hospedeiro à infecção, mas também pode levar ao dano tecidual (RASSI JR *et al.*, 2009). Entre outros fatores, o controle do parasitismo tecidual e sanguíneo pela ação da resposta imune irão determinar as manifestações clínicas do hospedeiro na fase aguda e principalmente na fase crônica da infecção (FERNANDES E ANDREWS, 2012; BONNEY *et al.*, 2018). O parasito mostra um tropismo particular para as fibras musculares cardíacas, embora a cardiopatia chagásica na fase aguda ocorre em menos de 1% dos infectados (BONNEY *et al.*, 2018). Em pacientes sintomáticos há evidências de dano, caracterizado por vacuolização, miocitólise e degeneração miofibrilar como consequência do infiltrado inflamatório, composto de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e principalmente linfócitos T CD8⁺ (ANDRADE *et al.*, 2014; BONNEY *et al.*, 2018). No entanto, a medida que a resposta imune adaptativa do hospedeiro progride, o número de células parasitadas e infiltrado inflamatório diminuem drasticamente, com consequente início da fase crônica (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

A maioria das pessoas não apresentam quaisquer sinais ou sintomas clínicos durante a fase crônica. No entanto, aproximadamente 5 a 10% podem apresentar alterações no sistema nervoso entérico conhecidas como, megaloesôfago ou megacólon (MATSUDA *et al.*, 2009). Outra parte dos pacientes podem apresentar alterações inflamatórias no tecido cardíaco que alteram a morfologia e funcionalidade desse órgão em aproximadamente 30% dos indivíduos infectados (RASSI Jr *et al.*, 2009; LEWIS E KELLY, 2016)

O controle do parasitismo na fase aguda da infecção, não elimina o parasito que pode sobreviver por muitas décadas no hospedeiro, mas os fatores que desencadeiam as alterações patológicas na fase crônica ainda não são totalmente compreendidos (TEIXEIRA *et al.*, 2011). Dentre outros fatores, acredita-se que o estímulo imunológico gerado pela persistência de *Trypanosoma cruzi* no tecido possa ativar mecanismos autoimunes do hospedeiro que culminam no dano tecidual (CARDILLO *et al.*, 2015; DE BONA *et al.*, 2018).

O comprometimento cardíaco é a forma clínica mais expressiva da doença de Chagas crônica, principalmente por sua alta morbimortalidade (PEREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). Em contraste com a fase aguda, o infiltrado inflamatório na fase crônica é focal e geralmente há predomínio de células T, macrófagos, com alguns eosinófilos no tecido cardíaco desses

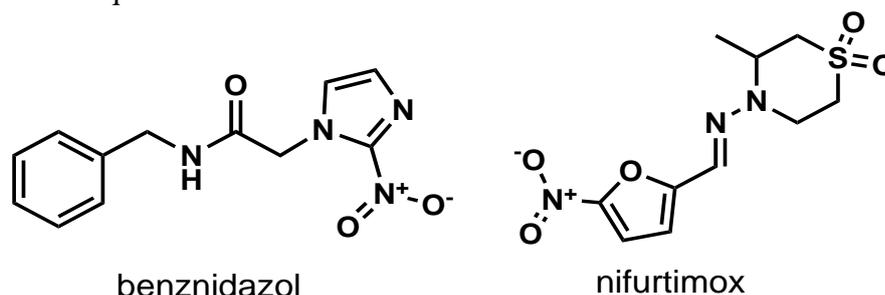
pacientes chagásicos crônicos (TEIXEIRA *et al.*, 2011; BONNEY *et al.*, 2018). Características patológicas clássicas da cardiomiopatia chagásica crônica incluem, miocardite de baixo grau acompanhada por miocitólise, hipertrofia das fibras musculares e fibrose intersticial (ROSSI E BESTETTI, 1995; BONNEY *et al.*, 2018). O processo é predominantemente miocárdico, o que resulta em uma miocardite fibrosante evolutiva com comprometimento do processo de formação do estímulo cardíaco (MARIN-NETO *et al.*, 2007; BONNEY E ENGMAN, 2008). Tais danos geram anormalidades como, arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita, de modo que esse último ocorre na maioria dos casos (RASSI JR *et al.*, 2009)

As alterações patológicas características de megaesôfago e megacólon são consequências das alterações no sistema nervoso autônomo que coordenam a motilidade intestinal (NOGUEIRA-PAIVA *et al.*, 2014). As sequenciais lesões inflamatórias mediadas principalmente por linfócitos T levam a destruição de neurônios parassimpáticos e desnervação no plexo mioentérico de Auerbach e Meissner, responsável pela contratilidade intestinal (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; MATSUDA *et al.*, 2009). Essas lesões estão distribuídas aleatoriamente no esôfago, estômago e intestino delgado e grosso, mas a acalasia dos esfíncteres é um achado comum em pacientes chagásicos com quadro de megaesôfago e megacólon (MATSUDA *et al.*, 2009; JABARI *et al.*, 2014).

1.1.2 Quimioterapia

Os fármacos nitroheterocíclicos nifurtimox (NFX) e benznidazol (BZ) são as únicas terapias disponíveis para o tratamento da doença de Chagas (MANARIN *et al.*, 2013). Estudos sugerem que ambas sofrem bioativação hepática, catalisada por nitrorredutases tipo I ou II, para produzir metabolitos ativos (Figura 2) (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; URBINA, 2010; HALL *et al.*, 2011; HALL E WILKINSON, 2012).

Figura 2. Estrutura química do Nifurtimox e Benznidazol



Fonte: Própria (2019)

A redução química no anel nitrofurano da moléculas do NFX pela ação da enzima nitrorredutases tipo II dependentes de NAD(P)H leva à formação de um intermediário nitroânion ($R-NO_2^-$) fortemente reativo com oxigênio (HALL *et al.*, 2011; SALES JUNIOR *et al.*, 2017). Na presença de oxigênio, o intermediário sofre reoxidação com produção concomitante de ânions superóxido (O_2^-) principal responsável pelos danos oxidativos ao parasito (URBINA, 2010). Alternativamente, a redução de BZ por nitrorredutases tipo I dependente de NADPH parece não desencadear a função oxidativa, mas gerar intermediários reativos, como hidroxilamina (NH_2OH) e o dialdeído glioxial, que tem alta afinidade por macromoléculas vitais para *Trypanosoma cruzi* (CHAUHAN *et al.*, 2008; HALL E WILKINSON, 2012).

Os pesquisadores acreditam que esses mecanismos conferem a ação tripanocida do fármaco, mas poderia estar associada aos efeitos adversos durante o tratamento dos pacientes (CASTRO *et al.*, 2006; URBINA, 2010). Os intermediários nitroreduzidos podem causar efeitos tóxicos a células hospedeiras e provocar diversos efeitos colaterais que muitas vezes, culminam na suspensão do tratamento (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; MARIN-NETO *et al.*, 2009; RASSI *et al.*, 2017).

Os efeitos secundários mais frequentes para o uso do benznidazol são as manifestações cutâneas (hipersensibilidade e dermatite com erupções cutâneas), anorexia, perda de peso, vômitos e alterações psíquicas além de edema generalizado, dor muscular e articular (CASTRO E DIAZ DE TORANZO, 1988; URBINA, 2010). Depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose representam as manifestações mais graves (CASTRO E DIAZ DE TORANZO, 1988; URBINA, 2002; CASTRO *et al.*, 2006).

Ao contrário das nitrorredutases do tipo I, as enzimas do tipo II não são específicas do *Trypanosoma cruzi* e o processo de redução hepática do grupo amino do NFX podem levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) tóxicas para as células do hospedeiro (MORILLA E ROMERO, 2015). Anorexia, perda de peso, alterações psíquicas e manifestações digestivas, tais como náuseas ou vômitos são os principais efeitos adversos demonstrados após tratamento com NFX (CASTRO E DIAZ DE TORANZO, 1988; MAYA *et al.*, 2003). Além disso, o uso desse composto é contraindicado para mulheres grávidas ou para pacientes com doenças renais ou hepáticas graves (HALL *et al.*, 2011). Os efeitos adversos do uso NFX comprometem a segurança para uso em pacientes chagásicos, de modo que a venda dele foi proibida na maioria dos países, inclusive no Brasil (MARIN-NETO *et al.*, 2009)

Outra limitação para ambas substâncias reside especialmente na baixa atividade antiparasitária durante a fase crônica, pois é a forma de maior importância epidemiológica pelas

altas taxas de morbimortalidade (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MORILLO *et al.*, 2015; RASSI *et al.*, 2017). Um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, denominado BENEFIT (do inglês, *BENZnidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*), mostrou que tratamento com BZ em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica avançada não reduz as alterações cardiovasculares ou as taxas de mortalidade entre os pacientes (MORILLO *et al.*, 2015; RASSI *et al.*, 2017).

Os mecanismos da falha terapêutica do BZ nessa fase ainda não são totalmente compreendidos, mas dados recentemente publicados sugerem que os parasitos possam viver em um estado dormente por anos no hospedeiro sem reconhecimento da resposta imune (ALVAREZ *et al.*, 2014). De fato, Sánchez-Valdéz e colaboradores mostraram que amastigotas dormentes não proliferativos, podem transformar-se em tripomastigotas e infectar novas células para manter um nível basal de sobrevivência no hospedeiro. Essa condição também explicaria o fracasso de compostos nitroheterocíclicos na fase crônica da infecção, uma vez que os compostos não possuem atividade contra as formas dormentes (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). Diante dos fatos, a pesquisa de novos tratamentos para a doença de Chagas é urgentemente necessária, principalmente na descoberta de terapias alternativas que atuem de maneira efetiva em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica.

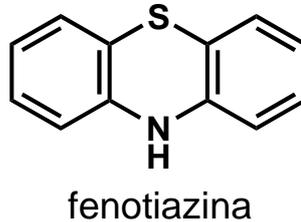
1.2 Fenotiazínicos

Os estudos pioneiros dos compostos fenotiazínicos tiveram início na segunda metade do século XIX, quando o químico alemão Heinrich August Bernthsen descreveu a estrutura química do fenotiazínico, azul de metileno (MB, do inglês *methylene blue*), sintetizado pela primeira vez em 1876 (VARGA *et al.*, 2017). Amplamente utilizado como corante pela indústria têxtil naquele século, o MB foi estudado como corante histológico de patógenos durante os estudos de microscopia do físico alemão Paul Ehrlich (SCHIRMER *et al.*, 2011; BUCHWALOW *et al.*, 2015). Curiosamente, Ehrlich notou que protozoários e bactérias eram preferencialmente corados em um esfregaço sanguíneo, o que ele acreditou ser um indicativo do potencial terapêutico desse composto (BUCHWALOW *et al.*, 2015).

Desde então, o corante foi indicado para tratamento da malária durante décadas, principalmente para conter as epidemias entre soldados que lutaram na primeira e na segunda Guerra Mundial (SCHIRMER *et al.*, 2011). No entanto, com o passar dos anos o MB foi substituído por outros antimaláricos mais específicos e ativos, como a cloroquina (BOSCH E ROSICH, 2008).

Os fenotiazínicos representam uma classe de substâncias orgânicas tricíclicas que contêm enxofre e nitrogênio ligados ao carbono 5 e 10 da molécula, respectivamente (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do fenotiazínico



Fonte: Fonte própria (2019)

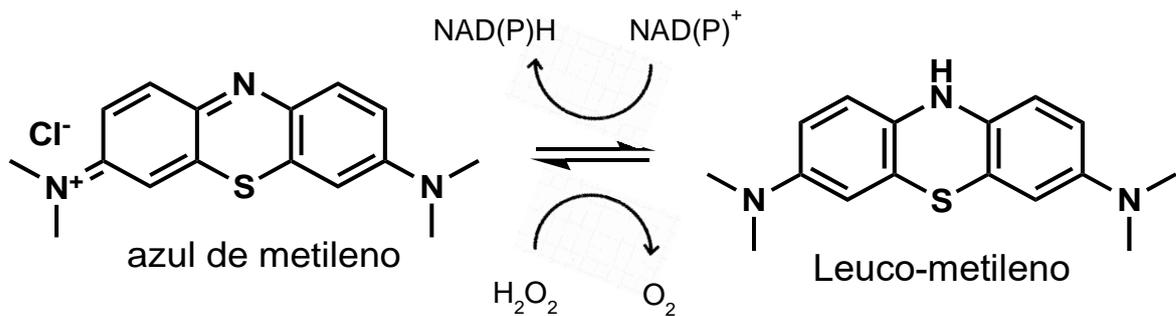
Pela estrutura bastante simples, os fenotiazínicos permitem uma infinidade de reações químicas para gerar análogos funcionalmente importantes para o tratamento de inúmeras patologias (MOSNAIM *et al.*, 2006). Mais de cinco mil análogos dessa classe de substâncias já foram obtidos. A grande maioria dos fenotiazínicos substituídos na posição do carbono 10 (C-10) exibem potente atividade como antipsicóticos e anti-histamínicos. Embora desenvolvidos há muitos anos, a Clorpromazina e Levomepromazina são fármacos aprovados pelo FDA (do inglês, *Food and drug administration*) e ainda usados como agentes antipsicóticos (PLUTA *et al.*, 2011).

Certamente, o MB tem sido o fenotiazínico mais estudado nos últimos anos, principalmente pelo seu incrível efeito pleiotrópico (SCHIRMER *et al.*, 2011). O pleiotropismo é uma característica de alguns substâncias ou metabolitos deles, de atuarem em diferentes alvos moleculares para exercer uma função biológica (LU *et al.*, 2018). Indicações atuais para MB aprovadas pelo FDA incluem o tratamento da metemoglobinemia hereditária e aguda (PROVAYBLUE™) (CAWEIN *et al.*, 1964), prevenção de infecções do trato urinário em pacientes idosos (UROLENE BLUE™), malária pediátrica (COULIBALY *et al.*, 2009) e na prevenção ou tratamento da neurotoxicidade induzida pelo fármaco Isofosfamida (KUPFER *et al.*, 1994). O MB também tem sido considerado eficaz no priapismo, contra o choque séptico (bloqueando a guanilato-ciclase dependente de NO) e doença de Alzheimer (OZ *et al.*, 2009; ATAMNA E KUMAR, 2010).

Nos últimos anos, os estudos do papel do MB no tratamento da malária foram revisados como uma estratégia terapêutica no combate ao aumento dos casos de resistência do protozoário aos tratamentos padrões (COULIBALY *et al.*, 2009; COULIBALY *et al.*, 2015). Tanto o MB quanto os produtos desmetilados dele, demonstram reatividade e afinidade principalmente nas

vias relacionados ao balanço oxidativo (HOWLAND, 2016). A redução enzimática de MB dependente de NADPH, gera o metabolito sem cor, leucoMB que pode ser reoxidado por oxigênio molecular (O_2) ou por substâncias contendo ferro (III), como metemoglobina. O NADPH e O_2 são consumidos nesse processo e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido em cada ciclo do ciclo (Figura 4) (SCHIRMER *et al.*, 2003; BUCHHOLZ *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2018).

Figura 4. Mecanismo de ação de MB como substrato no ciclo-redox da GR de *P. falciparum*



Fonte. Fonte própria (2019)

A fim de sobreviver no hospedeiro humano e no vetor da malária, *Anopheles*, os parasitos da malária dependem de uma eficiente defesa antioxidante e adequada regulação do ciclo redox (BUCHHOLZ *et al.*, 2008). Dentre outras enzimas, a flavoenzima glutatona redutase (GR) desempenham importante função de detoxificação no *Plasmodium* sp. O MB pode ser um reduzido e/ou substrato do ciclo redox da glutatona reductase do parasito. Independente da via, a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido (O_2^-) ou H_2O_2 , aumentam a cada ciclo de reoxidação de MB e extrapolam a capacidade de detoxificação intracelular. Esses produtos são tóxicos ao protozoário, principalmente para as formas sanguíneas (SCHIRMER *et al.*, 2003; BUCHHOLZ *et al.*, 2008). É importante citar que o MB tem sido estudado em combinação a outros fármacos antimaláricos, como pirimetamina, quinina e artesunato-amadioquina (GARAVITO *et al.*, 2012).

Por um mecanismo bastante semelhante ao descrito acima, MB parece ser ativo contra outros protozoários. Boda e colaboradores, mostraram que o MB apresentou forte atividade contra *Trypanosoma brucei* em protocolos *in vitro*. A ação de MB foi capaz de inibir as formas tripomastigotas em concentrações nanomolares (BODA *et al.*, 2006). Outros trabalhos também

demonstraram os efeitos de MB sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* sp (MAUEL, 1984; GIRONES *et al.*, 2006; KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2007; SBEGHEN *et al.*, 2015).

Os tripanosomatídeos possuem um sistema de detoxificação formados por tióis, especificamente por ação da enzima tripanotiona redutase (TR). Essa flavoenzima dependente de NADPH, catalisa a redução de tripanotiona dissulfeto (TS₂) para tripanotiona ditiol (T(SH)₂) (KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2007; FLOHE, 2012). Os tripanosomatídeos não possuem as enzimas GR ou a tiorredoxina redutase, de modo que a TR é a única conexão entre os sistemas redox baseados em NADPH e tiol (KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2007; BEIG *et al.*, 2015). Com uma homologia em cerca de 40% com a GR, alguns estudos sugerem que a TR também possa ser alvo da ação de MB, que podem inibir a atividade ou ser substrato subversivo da TR (BODA *et al.*, 2006; BUCHHOLZ *et al.*, 2008; BEIG *et al.*, 2015). Quando o sistema MB-enzima-O₂ atuam conjuntamente como redutores, uma espécie reativa de oxigênio, H₂O₂ ou superóxido é produzida em cada ciclo, o que gera alta toxicidade para o parasito (BUCHHOLZ *et al.*, 2008; BEIG *et al.*, 2015).

É importante citar, que uma das formas mais eficazes de causar desequilíbrio redox nas células é o uso da fotoativação. Nesse aspecto, a classe de compostos fenotiazínicos representam outra importante fonte da atividade biológica por atuarem como fotossensibilizadores (FS) importantes na terapia fotodinâmica (TFD) (DAI *et al.*, 2009; WAINWRIGHT *et al.*, 2011). A exposição de um fotossensibilizador à luz de um comprimento de onda específico levará à absorção de luz e à produção de espécies excitadas que em última análise, transferem a energia de excitação para o oxigênio para gerar EROs (GABRIELLI *et al.*, 2004; BAPTISTA E WAINWRIGHT, 2011)

Nesse sentido, os FS têm sido estudado de maneira bastante abrangente contra vírus (LAGO *et al.*, 2018), bactérias (NEMEZIO *et al.*, 2017), fungos (TRZASKA *et al.*, 2017), *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (GIRONES *et al.*, 2006; WAINWRIGHT E BAPTISTA, 2011). Uma vez que o *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida dependente da passagem pelo sangue do hospedeiro, estudos sugerem que MB é eficaz contra as formas tripomastigotas sanguíneas na presença de luz, tanto em protocolos *in vitro* como *in vivo* (GIRONES *et al.*, 2006).

Sbeghen e colaboradores demonstraram que hamsters infectados por *Leishmania braziliensis* apresentaram cicatrização e redução significativa das lesões cutâneas após tratamento com MB durante uma hora sob laser de emissão vermelha (660nm) (SBEGHEN *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que a TFD mediada por 50 µM de MB em promastigotas de

L. amazonensis causou alterações na permeabilidade da membrana celular e despolarização da membrana mitocondrial do parasito. Alterações ultraestruturas vacuolização intensa do citoplasma, aumento de todo o complexo mitocôndria e citoplasma também foram relatados (AURELIANO *et al.*, 2018).

Dada a grande versatilidade e possibilidade de aplicações biológicas para MB e análogos, o papel dos fenotiazínicos na infecção por protozoário é ainda inexplorado. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade e mecanismo de ação do MB e análogos deles na infecção experimental *in vitro* e *in vivo* pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi determinar o potencial tripanocida de corantes fenotiazínicos, combinados ou não ao benznidazol, em protocolos *in vitro* e *in vivo* de infecção pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial tripanocida *in vitro* de quatro compostos fenotiazínicos comerciais (azul de metileno, novo azul de metileno, azul de toluidina e 1,9 dimetil azul de metileno) e quatro não comerciais (DO15, DO16, DO37 e DO43), combinados ou não ao BZ, contra as formas amastigotas da cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ Determinar o potencial farmacológico dos fenotiazínicos com maior atividade biológica *in vitro*, em modelos experimentais *in vivo* de fase aguda de infecção *Trypanosoma cruzi* a partir da quantificação do parasitismo sanguíneo;
- ✓ Quantificar a carga de DNA do parasito pelo método de qPCR e contagem de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, após tratamento de camundongos com os corantes fenotiazínicos combinados ou não ao benznidazol;
- ✓ Avaliar parâmetros bioquímicos no plasma e mediadores imunológicos no timo e baço de camundongos infectados pela cepa Y após tratamento com os corantes fenotiazínicos combinados ou não ao benznidazol.

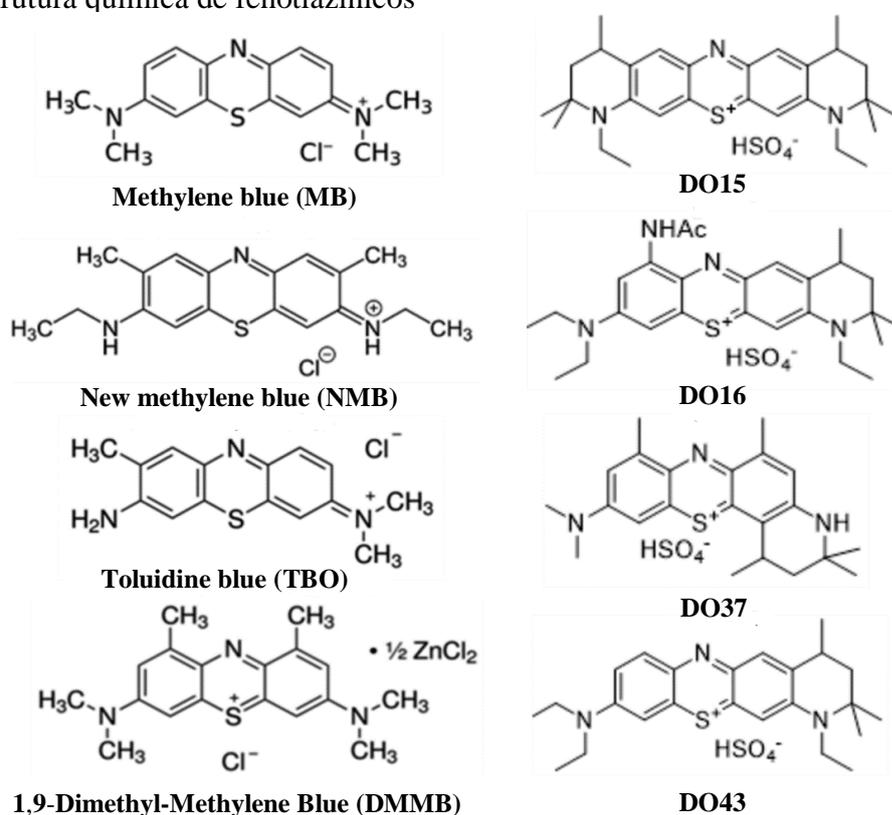
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaios *in vitro*

3.1.1 Compostos

Um total de oito corantes fenotiazínicos foram estudados nesse trabalho: quatro comerciais, azul de metileno (MB, do inglês *Methylene Blue*), novo azul de metileno (NMB, do inglês *New Methylene Blue*), azul de toluidina O (TBO, do inglês *Toluidine Blue O*) e 1,9-dimetil-azul de metileno (DMMB, do inglês *1,9-Dimethyl-Methylene Blue*) e quatro não comerciais, DO15, DO16, DO37 e DO43 (Figura 5).

Figura 5. Estrutura química de fenotiazínicos



Os quatro últimos foram sintetizados e fornecidos pelo Prof. Dr. Mark Wainwright, da Liverpool John Moores University, Inglaterra (WAINWRIGHT *et al.*, 2011). O Benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, Sigma-Aldrich - St. Louis, M, EUA) foi utilizado como composto de referência em todos os ensaios. Os corantes foram dissolvidos em água milliQ estéril e o BZ foi dissolvido em 100% de DMSO (dimetilsulfóxido). A concentração do solvente nos experimentos foi menor que 1%.

3.1.2 Células e parasitos

Células epiteliais do tecido renal de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), denominada LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*, Sigma-Aldrich; St. Louis, M, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich; St. Louis, M, EUA), 50 U/mL de penicilina, 0,05 mg/mL de estreptomicina. O ensaio tripanocida *in vitro* foi realizado contra formas amastigotas da cepa Tulahuen, uma cepa geneticamente modificada para expressar o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*) (BUCKNER *et al.*, 1996). O ciclo de *Trypanosoma cruzi in vitro* foi mantido por infecções semanais das células LLCMK2 pelas formas tripomastigotas da cepa Tulahuen.

3.1.3 Atividade biológica contra as formas amastigotas

Células LLC-MK2 foram incubadas na concentração de 5×10^4 células/mL em placas de 96 poços e infectadas com as formas tripomastigotas da cepa tulahuen na concentração de 5×10^5 células/mL (1:10 células/parasitos). Após 48 h, as células infectadas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino 1x (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) para remoção dos parasitos não internalizados e 200 μ L de meio RPMI foram adicionados com as diluições seriadas dos fenotiazínicos e BZ (10 μ M a 0,0195 μ M) em duplicata. Após 72 h, a viabilidade dos amastigotas foi determinada pela adição de PBS contendo 2% de Triton X-100 e 200 μ M de CPRG (Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside). Amastigotas viáveis produzem a enzima β -galactosidase que catalisa a hidrólise do reagente amarelo CPRG em um cromóforo vermelho facilmente detectado por absorvância a 570 nm (leitor de microplaca - Synergy™ H1) após 4 h de incubação a 37 ° C. Os resultados de atividade tripanocida foram calculados em porcentagem pela fórmula $((\text{ABS}_{\text{controle}} - \text{ABS}_{\text{amostra}}) / \text{ABS}_{\text{controle}}) * 100$, onde $\text{ABS}_{\text{controle}}$ representa a absorvância média do controle sem tratamento (amastigotas viáveis) e $\text{ABS}_{\text{amostra}}$, a absorvância de cada concentração do tratamentos adotados.

3.1.4 Citotoxicidade em células de mamíferos

LLC-MK2 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de 5×10^4 células/mL. Após 48 h, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e 200 μ L de meio RPMI foram adicionados com as diluições seriadas dos fenotiazínicos e BZ (100 μ M a 0.78 μ M) em

duplicata. Após 72h a 37°C, a ação citotóxica das substâncias foi determinada pelo ensaio clássico de MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (MOSMANN, 1983). Em resumo, 50 µL de MTT dissolvidos em PBS (2,0 mg/mL) foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas durante 4 h a 37 °C. O MTT é um composto hidrossolúvel de cor amarela, reduzido pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis ao composto *formazan* de coloração azul-escuro insolúvel, que fica armazenado no citoplasma celular. Os cristais de formazan foram dissolvidos com DMSO (50 µL/poço) e a absorbância das amostras foram medidas em espectrofotômetro a 570 nm após 30 min. Os resultados de citotoxicidade foram calculados em porcentagem pela fórmula $((ABS_{controle} - ABS_{amostra} / ABS_{controle}) * 100)$, onde $ABS_{controle}$ representa a absorbância média do controle sem tratamento (células viáveis) e $ABS_{amostra}$, a absorbância de cada concentração dos tratamentos adotados.

3.1.5 Atividade sinérgica dos compostos

A determinação dos efeitos da combinação entre as substâncias foi realizada sobre as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* como descrito na seção anterior (item 2.1.3). Após 48 h, as células LLC-MK2 infectadas foram lavadas duas vezes em PBS (1x) para remover parasitos não internalizados e 200 µL de meio RPMI foram adicionados em sete concentrações fracionadas dos compostos, combinados ou não, a partir do valor de $2 \times IC_{50}$ ($2 \times IC_{50}$; $1,6 \times IC_{50}$; $1,3 \times IC_{50}$; IC_{50} ; $0,7 \times IC_{50}$; $0,5 \times IC_{50}$; $0,2 \times IC_{50}$). A combinação entre as substâncias foi representada na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Combinação de corantes fenotiazínicos e Benznidazol para estudo de efeito sinérgico *in vitro*.

Substância A	Substância B	Combo
BZ	MB	BZ+MB
BZ	NMB	BZ+NMB
BZ	TBO	BZ+TBO
BZ	DMMB	BZ+DMMB
MB	NMB	MB+NMB
MB	TBO	MB+TBO
MB	DMMB	MB+DMMB

NMB	TBO	NMB+TBO
NMB	DMMB	NMB+DMMB
TBO	DMMB	TBO+DMMB

Após 72h de incubação, a viabilidade dos amastigotas foi determinada pela adição de PBS contendo 2% de Triton X-100 e 200 μ M de CPRG. A inibição proliferativa pelas substâncias foi realizada em triplicata em três experimentos independentes. A interação das substâncias foi determinada pelo método de Chou-Talalay, baseado na equação de efeito mediano, que fornece dados teóricos para o cálculo do índice de combinação (CI), representado pela fórmula $(IC_{50} \text{ da substância A combinado a B} / IC_{50} \text{ da substância A}) + (IC_{50} \text{ da substância B combinado a A} / IC_{50} \text{ da substância B sozinha})$ (BERENBAUM, 1978; CHOU E TALALAY, 1984). Três tipos de interações podem ser obtidos a partir dos valores do IC: Sinergismo ($CI < 1$), Aditivo ($CI = 1$) e Antagonismo ($CI > 1$) (CHOU, 2010).

3.2 Ensaios *in vivo*

3.2.1 Animais e parasitos

Um total de 45 camundongos machos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*), com 6 semanas de idade e peso médio de 19,64g ($DP \pm 1,60g$) foram distribuídos em 9 grupos ($n=5$). Os animais foram mantidos, com água filtrada e ração comercial *ad libitum*, em minis isoladores (32 x 20 x 21cm) anexados a uma estante ventilada Alesco® (Monte Mor, SP, Brasil) de uma sala mantida com ciclo de 12h luz/12h escuro e temperatura constante de 22°C. Os camundongos foram experimentalmente infectados por via intraperitoneal com 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y obtidas do sangue de animais infectados (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG *et al.*, 1953). A cepa Y é mantida por passagens seriadas semanais em camundongos BALB/c no Laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP.

3.2.2 Tratamento

Os ensaios *in vivo* foram delineados para aqueles fenotiazínicos de melhor atividade *in vitro* para explorar o potencial terapêutico deles combinados ou não ao BZ em modelo experimental de fase aguda da infecção. A dose clínica experimental de BZ (100 mg/kg) foi

utilizada como controle farmacológico. Para determinação do efeito da combinação entre as substâncias foi utilizado uma dose reduzida de BZ (10 mg/kg) para evitar a supressão completa da parasitemia e permitir uma avaliação dos efeitos da terapia combinada. A dosagem dos fenotiazínicos foi determinada com base nos protocolos de tratamento com MB na infecção pela malária (SCHIRMER *et al.*, 2003; GARAVITO *et al.*, 2012). BZ foram diluídos em H₂O filtrada e 5% de DMSO e os fenotiazínicos diluídos apenas em H₂O (Tabela 2).

Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais em acordo com os tratamentos e dose administradas no estudo *in vivo*

Grupos	Infecção	Tratamento Substância/Dose
Grupo I (Controle) C	Não	Água
Grupo II (Controle infectado) CI	Sim	Água
Grupo III BZ100	Sim	Benznidazol 100mg/kg
Grupo IV BZ10	Sim	Benznidazol 10mg/kg
Grupo V MB	Sim	Azul de Metileno 10mg/kg
Grupo VI DMMB	Sim	1,9-dimetil azul de metileno 10mg/kg
Grupo VII BZ10+MB10	Sim	Benznidazol 10mg/kg + Azul de Metileno 10mg/kg
Grupo VIII BZ10+DMMB10	Sim	Benznidazol 10mg/kg + 1,9-dimetil azul de metileno 10mg/kg
Grupo IX MB+DMMB	Sim	Azul de Metileno 10mg/kg + 1,9-dimetil azul de metileno 10mg/kg

Os tratamentos foram administrados oralmente por gavagem, em dose única diária, por um período de 10 dias consecutivos, com início do tratamento 48h após a infecção (Tabela 2). Cada animal recebeu diariamente a dose diluída em 100µL. Os dados do peso de cada animal foram obtidos no primeiro e último (pré-morte) dia após a infecção.

Após término do tratamento os animais foram mortos por exsanguinação com anestesia prévia de Uretana (1000 mg/kg⁻¹) para coleta do sangue total, coração, fígado, baço e timo. O coração foi excisado em sentido longitudinal em duas partes iguais, onde uma das partes foi destinada a histologia e a outra para quantificação da infecção do tecido cardíaco por PCR

quantitativo em tempo real (qPCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction quantitative Real Time*). O sangue total foi coletado com anticoagulante (heparina) para obtenção do plasma para quantificação de enzimas hepáticas (ALT e AST). Por fim, baço e timo foram utilizados para determinação de parâmetros imunológicos.

3.2.3 Parasitismo sanguíneo

O desenvolvimento da fase aguda de infecção e a resposta aos tratamentos propostos foram monitorados por uma curva de parasitemia obtida pela coleta de 5 µL de sangue da cauda dos animais infectados, a cada 48 horas a partir do 5º dia após a infecção (5º, 7º, 9º, 11º dia). O sangue foi examinado pela contagem de 50 campos entre lamina e lamínula (22x22 mm) após observação direta ao microscópio óptico (objetiva no aumento de 40 vezes). A quantificação parasitária foi realizada pelo método de Brener (BRENER, 1962).

3.3 Quantificação do parasitismo do tecido cardíaco por qPCR

3.3.1 Extração do DNA

Aproximadamente, 5 mg de tecido cardíaco foram removidos para extração do DNA total pelo kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System - Promega® (Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA extraído foi determinada por eletroforese em gel de agarose (1%) sob tampão TAE (tampão Tris- Acetato-EDTA, pH 8.0). Um volume de 5 µL da amostra de DNA foi adicionado ao tampão de carregamento de coloração azul (Gel Loading Dye Blue (6X), New England Biolabs) para rastreamento da migração das bandas no gel de agarose. Paralelamente, foi acrescentado 5 µL do marcador padrão (DNA ladder) de peso molecular conhecido como controle positivo da corrida amostral. Por fim, a visualização das bandas de DNA foi determinada por um corante fluorescente vermelho (*Gel red*), diluído (1:500) ao gel de agarose, que se liga a ácidos nucleicos e emite fluorescência sob luz ultravioleta. O DNA integro foi quantificado pelo Qubit™ Assay Kit – ThermoFisher Scientific® (Waltham, MA, EUA) e ajustado para a concentração de 10 ng/µL, em água livre de nucleases (Nuclease-free water, Promega® - Madison, WI, USA).

3.3.2 Construção de curva-padrão qPCR para quantificação do DNA de *Trypanosoma cruzi*

Após a extração do DNA da cultura de epimastigotas, a concentração foi ajustada para 21,75 ng/ μ L (concentração equivalente a 10^6 cópias de DNA). Uma cópia de material genético de *Trypanosoma cruzi* possui massa equivalente a 43,5 fg, o que permite calcular o número de cópias de DNA em concentrações conhecidas (DE FREITAS *et al.*, 2006). Portanto, 2 μ L de cada amostra (43,5 ng) foram adicionados nos poços e diluída seriadamente como mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Descrição do número de cópias do material genético de *Trypanosoma cruzi* em valores de massa e concentração utilizadas na confecção da curva-padrão. ng, nanogramas; pg, picogramas; fg, fentogramas

Nº de fitas	Massa	Concentração
10^6	43,5 ng	21,75 ng/ μ L
10^5	4,35 ng	2,175 ng/ μ L
10^4	435 pg	217,5 pg/ μ L
10^3	43,5 pg	21,75 pg/ μ L
10^2	4,35 pg	2,175 pg/ μ L
10^1	435 fg	217,5 fg/ μ L
10^0	43,5 fg	21,75 fg/ μ L

A quantificação do material de DNA permitiu o cálculo da seguinte fórmula: $Y = -4,23x + 27,65$, onde Y é o valor de Ct, -4,23 é o *slope* (inclinação da reta), 27,65 é a intersecção da reta com o eixo Y. Deste modo, o cálculo do número de cópias de DNA de *Trypanosoma cruzi* presente nas amostras foi estimado (x).

3.3.3 Amplificação das amostras

As amostras de DNA foram amplificadas a partir de iniciadores denominados Cruzi 1 (5'- AST CGGCTGATCGTTTTCGA-3') e Cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') cuja sequência gera um produto de 166 pares de bases (Tabela 4).

Tabela 4. Primers utilizados na reação de qPCR.

Primers	Sequência (5' – 3')	Concentração μM	Amplicon (pb)	Posição
Cruzi 1 (foward)	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	1	166	1-20
Cruzi 2 (reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	1	166	165-188

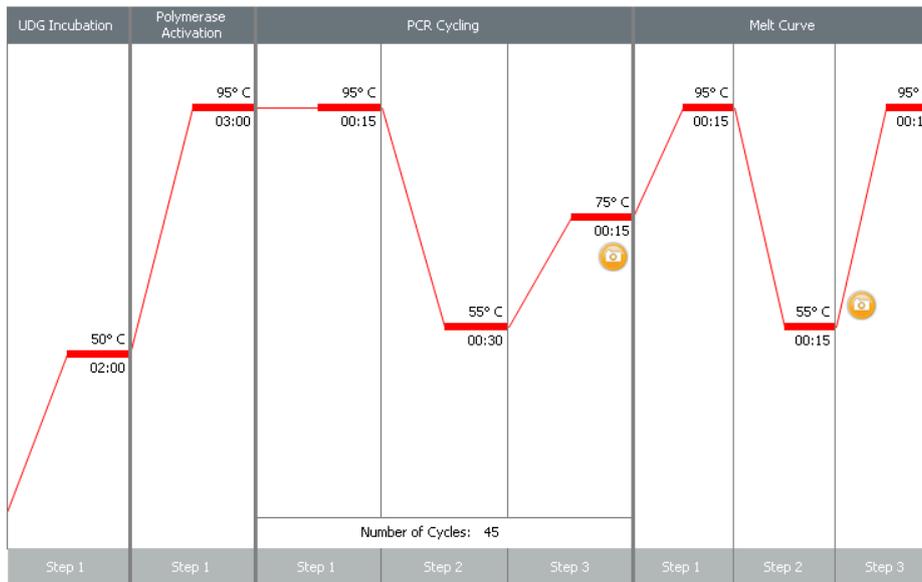
Na mistura de cada amostra e iniciadores foi adicionada uma alíquota do kit Master MixSYBR™- KAPA Biosystems® (Wilmington, MA, EUA). Finalmente, a combinação de cada amostra com iniciadores e Mix Syber™ foi aplicada em duplicata nas placas de 48 poços no volume final de 20 μL, como mostra a Tabela 3.

Tabela 5. Concentração e volume das amostras aplicadas na placa para a amplificação do material genético de *Trypanosoma cruzi*.

Amostras do qPCR	Volume	Concentração
Amostra de DNA	2 μL	10 ng/μL
<i>Primer foward</i>	4 μL	1 μM
<i>Primer reverse</i>	4 μL	1 μM
Mix SYBR™	10 μL	----

A cada placa foram adicionados em duplicata, um controle positivo correspondente ao material genético de *Trypanosoma cruzi* e um controle negativo representado pela água. As placas devidamente seladas foram centrifugadas a 100 g por 1 minuto e colocadas no termociclador Eco Real-Time System - Illumina® (San Diego, CA, EUA). O sistema foi submetido a 45 ciclos de desnaturação da dupla fita de DNA a 95°C, seguido do processo de anelamento dos primers a 55°C e por fim, a extensão da nova fita ocorrida em temperatura de 75°C (Figura 6) (WEI *et al.*, 2016).

Figura 6. Representação do ciclo de amplificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* por qPCR



Os valores de Ct para cada amostra foram gerados pelo software EcoStudy ao final das amplificações. As médias das duplicatas foram calculadas e o DNA quantificado de acordo com os valores obtidos pela curva-padrão. O valor final foi dividido pelo peso do órgão utilizado na extração do DNA (5 mg), que foi expresso em nº de cópias de *Trypanosoma cruzi*/mg tecido. A metodologia de quantificação por qPCR foi fundamentada nos trabalhos de Piron e colaboradores e Schijman e colaboradores (PIRON *et al.*, 2007; SCHIJMAN *et al.*, 2011; ZINGALES *et al.*, 2014)

3.4 Análise histopatológica

A parte do tecido cardíaco seccionada para histopatologia foi fixado em formol tamponado (PBS - formol 10,0%) e desidratados em solução de etanol 80% após 24h. Em seguida, as amostras foram diafanizados com xilol e emblocados em parafina. Os blocos de parafinas foram cortados, de maneira semi-seriada, com a ajuda de um micrótomo (Leica Biosystems®) a 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e observadas em microscópio Axioscop 40 Zeiss® (Thornwood, NY, EUA) com câmera acoplada, em objetiva de 40 vezes. Uma varredura completa dos ninhos de amastigotas em três secções foram obtidas para o cálculo da média de ninhos de amastigotas para cada animal. Portanto, os valores foram descritos em ninhos de amastigota/secção cardíaca.

3.5 Parâmetros Bioquímicos

O sangue total de cada animal colhido com heparina foi centrifugado a 948 g por 5 minutos para a obtenção do plasma. Alíquotas do plasma foram submetidas a quantificação de enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os dados bioquímicos foram obtidos após reação química com kit da LABTEST (Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com a instrução do fabricante para cada teste. Os resultados foram expressos em U/L.

3.6 Obtenção e preparo da suspensão de células do baço e timo

O baço e o timo de cada animal foi removido e o peso do timo foi obtido antes do início dos experimentos. Os órgãos foram macerados com auxílio de filtros para cultura celular (EASYstrainer™ Cell Sieves- Greiner) em meio RPMI. O volume de meio foi ajustado e os tubos com a suspensão de células foram centrifugadas por 411 g, 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 2mL do tampão hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 1mM, Na₂EDTA 0,1mM) foi adicionado apenas a suspensão de células do baço. Após 2 min de incubação um volume de 28 mL de PBS foi adicionado as amostras para bloquear a reação hemolítica. A suspensão de células do baço foram submetidas a uma nova centrifugação a 1500 rpm, 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 10 mL de RPMI foram adicionados a todas as amostras. Nessa etapa, 10 µL da suspensão de células do timo e baço foram adicionadas a 990 µL da solução de Azul de Trypan (0,4%) para contagem de células em câmara de Neubauer. A suspensão de células de cada amostra foi ajustada para a concentração 2x10⁶ células/100µL para realização dos ensaios de citometria.

3.7 Fenotipagem de Leucócitos Por Citometria De Fluxo

Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos direcionados a marcadores específicos da superfície de linfócitos, macrófagos e células dendríticas foram utilizados para fenotipar e determinar os perfis de maturação dos linfócitos no timo. Alíquotas de 100 µL suspensão de células do baço e timo (2x10⁶ células/100µL) foram incubadas com 10 µL de *Fcblock* (bloqueia ligações inespecíficas dos anticorpos aos receptores Fc na superfície celular) por 30 minutos a 4°C. Ao final da incubação, as amostras foram lavadas com PBS, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min e o sobrenadante descartado. Subsequentemente, as amostras foram

incubadas com 0,5 μ L dos anticorpos monoclonais conjugados (tabela 4) por 30 minutos a 4°C. Por fim, as amostras foram fixadas em 50 μ l de PBS-formol a 1%. Os anticorpos foram adquiridos da BD Bioscience, San Diego, CA, EUA.

Tabela 6. Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem das células tímicas e/ou esplênicas.

Anticorpo	Fluocromo	Descrição
Anti-CD3	PE	Receptor de membrana celular externa dos linfócitos
Anti-CD4	FITC	Receptor de membrana celular externa de subpopulação dos linfócitos T
Anti-CD8	APC	Receptor de membrana celular externa de subpopulação dos linfócitos T
CD11c	PE	Receptor de membrana celular externa de células dendríticas
F4/80	APC	Marcador constitutivo expresso em macrófagos
MHCII	FITC	Marcador de ativação celular

A aquisição do perfil fenotípico das células foi realizada por citometria de fluxo (FACs canto II; Becton Dickinson, San Jose, USA) que possui filtros e detectores específicos para cada fluorocromo. Os resultados adquiridos foram analisados no programa FlowJo (*FlowCytometry Analysis Software v7.2.5*) o qual permite uma análise total da população (20.000 eventos/amostra) e processamento individual de cada uma delas em janelas (“Gates”) de acordo com parâmetros de tamanho e granularidade ou fluorescência.

3.8 Análise Estatística

As porcentagens de inibição parasitária e citotoxicidade foram plotadas contra a respectiva concentração das substâncias para obtenção dos valores de IC50, o CC50 e o índice seletividade de cada substância (CC50/IC50). Esses dados foram expressos como média e desvio padrão (DP) de dois experiências independentes. Os resultados foram analisados por testes estatísticos com auxílio do software GraphPad Prism versão 5.0 e análise de variância *One Way ANOVA* seguido de *post hoc Dunnett*. Para os ensaios de sinergismo, três experimentos independentes foram realizados em três dias alternados. A interação das substâncias foi determinada pelo índice de combinação (CI do inglês, combination index) gerados no programa Compusyn (www.combosyn.com).

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram analisados por testes estatísticos, a partir da média e erro padrão de cada grupo, com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.0. A análise *One Way* ANOVA foi utilizada para comparação entre os grupos experimentais seguido de *post hoc Tukey*. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes

3.9 Aspectos Éticos

Os protocolos de experimentação em animais de laboratório foram conduzidos em acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei 11.974/08 e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) – Processo 18.1446.60.1 (Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1 Resultados *in vitro*

4.1.1 Inibição das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade sobre as células LLC-MK2

O experimento *in vitro* foi desenvolvido para avaliar o potencial biológico de oito corantes fenotiazínicos como agentes tripanocida. A atividade tripanocida foi descrita em valores de IC50 e foi comparada ao fármaco de referência, Benznidazol. A razão entre a atividade citotóxica (CC50) e a atividade tripanocida (IC50) também foi fornecida para avaliar o índice de seletividade para cada substância (SI = CC50/IC50). Quanto maior o SI, maior a seletividade das substâncias sobre os parasitos em relação a toxicidade para as células hospedeiras (Tabela 7).

Tabela 7. Inibição das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade sobre as células de mamíferos LLC-MK2. A concentração foi representada em μM . IC50 - concentração inibitória de 50% das formas amastigotas (cepa Tulahuen); CC50 - concentração citotóxica de 50% das células de mamíferos; SI, índice de seletividade representado pela razão de CC50 pelo IC50; MB, azul de metileno; NNM, novo azul de metileno; TBO, azul de toluidina; DMMB, 1,9-azul de metileno; BZ, benznidazol. Diferenças estatísticas entre os fenotiazínicos e BZ foram determinadas por *One Way ANOVA post hoc Dunnett* (* representa $p < 0.05$; *** representa $p < 0.001$).

SUBSTÂNCIAS	Amastigotas IC ₅₀ \pm SD	LLCMK2 CC ₅₀ \pm SD	SI CC ₅₀ /IC ₅₀
MB	0.4497 \pm 0.15***	16.82 \pm 1.18	37.40
NMB	0.0937 \pm 0.01***	4.19 \pm 1.30	44.71
TBO	0.2771 \pm 0.11***	7.93 \pm 5.22	28.61
DMMB	0.0870 \pm 0.02***	4,46 \pm 0.23	51.26
DO15	0.1856 \pm 0.02***	3.67 \pm 0.17	19.77
DO16	0.5766 \pm 0.21***	4.21 \pm 0.20	7.30
DO37	1,806 \pm 1.15*	14.74 \pm 4.49	8.18
DO43	0.6958 \pm 0.32***	8.45 \pm 0.09	12.14
BZ	3.415 \pm 0.38	> 200	> 58.65

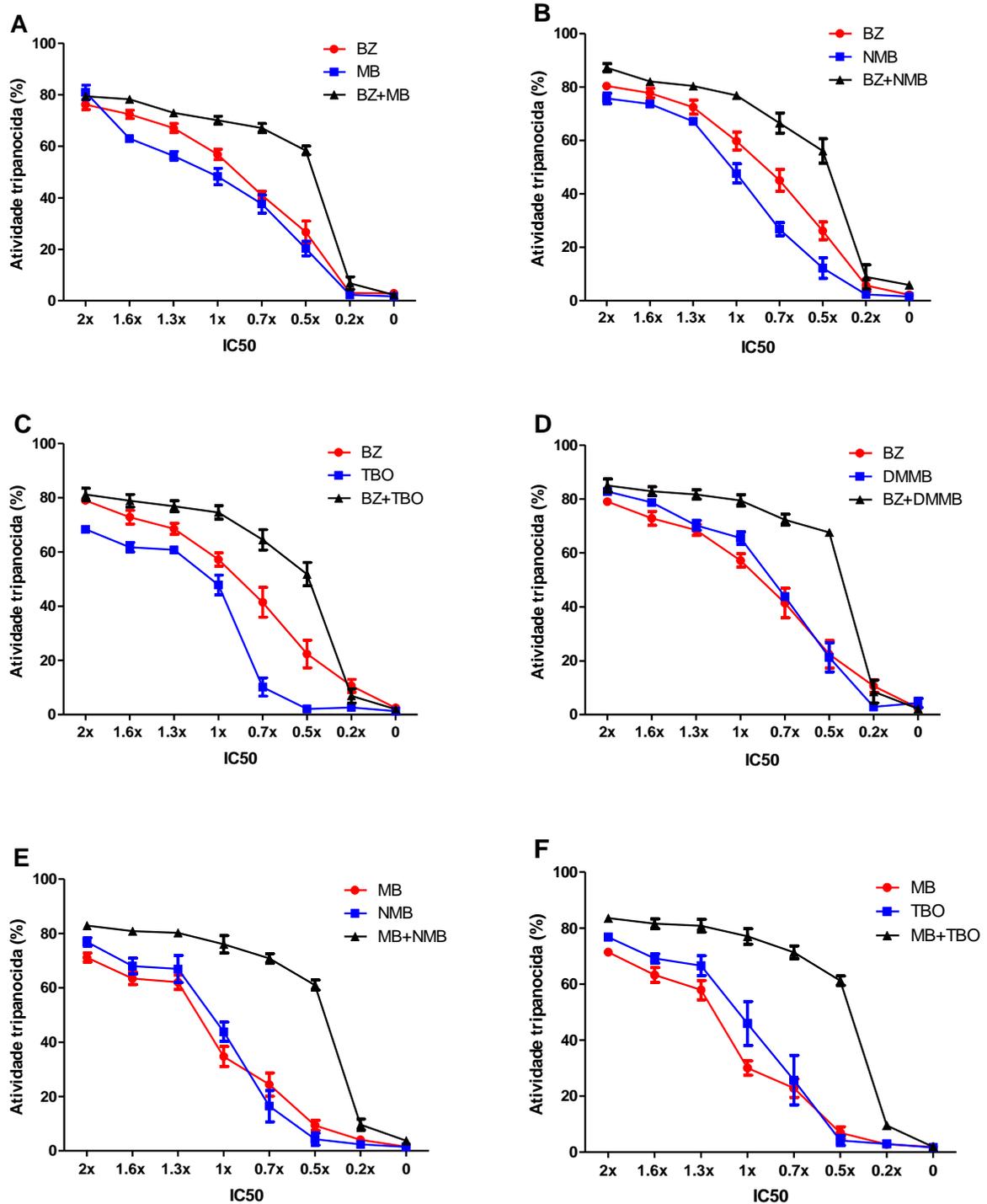
Os fenotiazínicos testados apresentaram forte atividade tripanocida em baixas concentrações e foram estatisticamente mais ativos que o BZ ($IC_{50}=3,415 \mu M$), especialmente NMB e DMMB, que demonstraram valores de IC_{50} inferiores a 100 nM. Todas as substâncias demonstraram citotoxicidade moderada em relação ao BZ ($CC_{50} > 100 \mu M$). No entanto, o fenotiazínico sintético DO15 foi o mais tóxico deles com $CC_{50}=4.19 \mu M$.

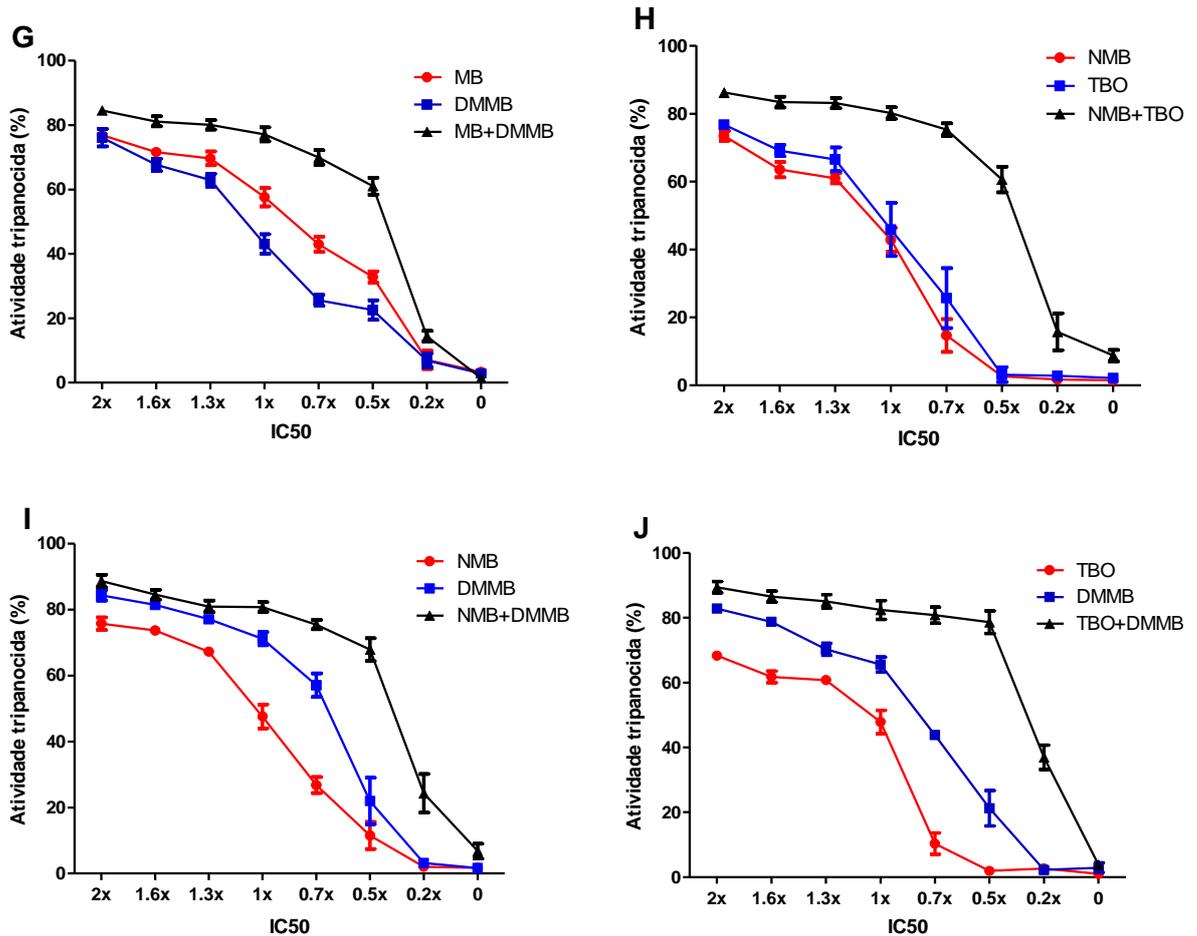
Embora a citotoxicidade seja um parâmetro importante para ensaios *in vitro*, com exceção das substâncias DO16 e DO43, as substâncias foram mais seletivas para as formas intracelulares e apresentaram valores de $SI > 10$ como preconizado para ensaios de triagem de substâncias anti-*Trypanosoma cruzi* (CHATELAIN E KONAR, 2015). NMB e DMMB foram as substâncias mais promissoras com $SI=44.71$ e $SI=51.26$, respectivamente.

4.1.2 Determinação da interação sinérgica dos fenotiazínicos e benznidazol contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para explorar um possível efeito sinérgico entre os fenotiazínicos comerciais e deles combinados ao BZ, ensaios de sinergismo foram realizados contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi in vitro*. Os dados de IC_{50} da monoterapia foram gerados como controle experimental para interpolação das curvas dose-resposta e obtenção do valor de CI. Os resultados de inibição parasitária para todas as combinações estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. Efeito tripanocida das combinações entre Benznidazol e corantes fenotiazínicos. As células infectadas com as formas amastigotas foram incubadas com sete diluições ($2xIC_{50}$; $1,6xIC_{50}$; $1,3xIC_{50}$; IC_{50} ; $0,7xIC_{50}$; $0,5xIC_{50}$; $0,2xIC_{50}$) de BZ, MB e BZ+MB (A); BZ, NMB e BZ+NMB (B); BZ, TBO e BZ+TBO (C); BZ, DMMB e BZ+DMMB (D); MB, NMB e MB+NMB (E); MB, TBO e MB+TBO (F); MB, DMMB e MB+DMMB (G); NMB, TBO e NMB+TBO (H), NMB, DMMB e NMB+DMMB (I), TBO, DMMB e TBO+DMMB (J). BZ, benznidazol; azul de metileno (MB), novo azul de metileno (NMB), azul de toluidina O (TBO), azul de 1,9-dimetil-metileno (DMMB).





A combinação entre os fenotiazínicos exibiram padrões distintos de inibição quando comparados entre si e ao BZ. Não houve diferença na atividade inibitória das formas amastigotas após tratamento com BZ e os corantes comerciais, associados ou não, em altas concentrações, exceto para BZ+NMB. Essa combinação inibiu 87,30% dos parasitos em comparação com 80,35% e 75,77% para a monoterapia de BZ e NMB, respectivamente (Figura 7.B). No entanto, a inibição não foi mantida em concentrações menores e o IC50 diminuiu apenas 1.40 vezes para o BZ e 1.79 vezes para NMB em relação aos valores de IC50 da monoterapia. Portanto, a combinação de ambos foi antagônica com CI de 1.264 (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação do sinergismo para fenotiazínicos e benznidazol contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle sem tratamento. As substâncias isoladas e em combinação foram avaliadas foram avaliadas concomitantemente na mesma placa para o cálculo dos valores de IC50 a partir da interpolação da curva dose-resposta. O IC50 representa a dose da inibição de 50% das formas amastigotas na monoterapia; IC50c, representa o novo cálculo do IC50 após a combinação de dois compostos. A razão de IC50 e IC50c representa a diferença (número de vezes) da concentração necessária de composto (combinado) para atingir o mesmo valor de IC50 da monoterapia. IC, índice de combinação; Valores <, =, e >1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. Fa, Fração afetada de 50%. Todos os dados foram obtidos a partir do programa CompuSyn

Combinação de substâncias	IC50 (µM)	IC50c (µM)	IC50/IC50c	Fa 0.5
				IC
BZ + MB	BZ= 3.31	BZ= 2.26	BZ= 0.682	1.27
	MB=0.4778	MB=0.2911	MB= 0.609	
BZ + NMB	BZ= 2.93	BZ= 2.09	BZ= 0.713	1.27
	NMB=0.100	NMB=0.056	NMB= 0.560	
BZ + TBO	BZ= 3.02	BZ= 2.25	BZ= 0.745	1.21
	TBO=0.380	TBO=0.178	TBO= 0.468	
BZ +DMMB	BZ= 3.02	BZ= 1.94	BZ= 0.642	1.28
	DMMB=0.078	DMMB=0.050	DMMB= 0.641	
MB + NMB	MB= 0.560	MB= 0.2472	MB= 0.441	0.89
	NMB=0.112	NMB=0.051	NMB= 0.455	
MB + TBO	MB= 0.588	MB= 0.2472	MB= 0.420	0.88
	TBO=0.322	TBO=0.1509	TBO= 0.468	
MB + DMMB	MB= 0.3916	MB= 0.2237	MB= 0.571	1.03
	DMMB=0.095	DMMB=0.044	DMMB= 0.463	
NMB + TBO	NMB= 0.1220	NMB= 0.042	NMB= 0.344	0.73
	TBO=0.3221	TBO=0.1265	TBO= 0.392	
NMB + DMMB	NMB= 0.1014	NMB= 0.034	NMB= 0.335	0.80
	DMMB= 0.071	DMMB=0.033	DMMB= 0.464	
TBO + DMMB	TBO= 0.3811	TBO= 0.063	TBO= 0.165	0.41
	DMMB=0.080	DMMB=0.020	DMMB= 0.250	

Embora seis pontos da curva indicam inibição parasitária acima de 60% em BZ+DMMB, não houve diferença sinérgica nos valores de IC50 da monoterapia (IC50 BZ 3.02 µM e DMMB 1.94 µM) em relação aos dados da combinação (IC50 BZ 1.94 µM e DMMB

0.050 μM . Consequentemente, a relação BZ+DMMB foi antagônica com valor de CI 1.28. O efeito também foi observado para os tratamentos BZ+MB e BZ +TBO que apresentaram valores de CI 1.29 e 1.21, respectivamente.

Ao contrário dos resultados acima, as diferentes combinações entre os fenotiazínicos foram sinérgicas, exceto pelo efeito aditivo entre MB+ DMMB com CI 1.03. O IC₅₀ de MB foi 0.3916 μM e DMMB 0.095 μM na monoterapia, após combinação os valores foram 0.2237 μM e 0.044 μM , respectivamente. NMB e TBO demonstraram forte atividade tripanocida na monoterapia quando combinados ao MB, com valor de CI de 0.89 e 0,88 para a associação MB+NMB e MB+TBO, respectivamente.

No entanto, a atividade sinérgica de NMB e DMMB foi maior quando combinados a TBO. Graficamente foi possível ver o maior deslocamento da curva para a direita correspondentes a forte atividade tripanocida das associações mesmo em baixas concentrações em NMB+TBO e TBO+DMMB (Figura 6.H e 6.J). NMB teve IC₅₀ de 0,1220 μM e TBO o IC₅₀ de 0.3221 μM na monoterapia e em combinação os valores foram IC₅₀ de 0.042 μM e 0.1265 μM com CI de 0.74. A combinação TBO+DMMB demonstrou inibição parasitária elevada e maior atividade sinérgica em relação a todas as outras combinações, com CI de 0.42 (Figura 6.J). O IC₅₀ diminuiu para 0,063 μM e 0,020 μM quando comparado com 0,3811 μM , e 0,080 μM da monoterapia com TBO e DMMB, respectivamente. Nenhuma citotoxicidade foi observada após tratamento combinado dos fenotiazínicos e BZ (dados não mostrados).

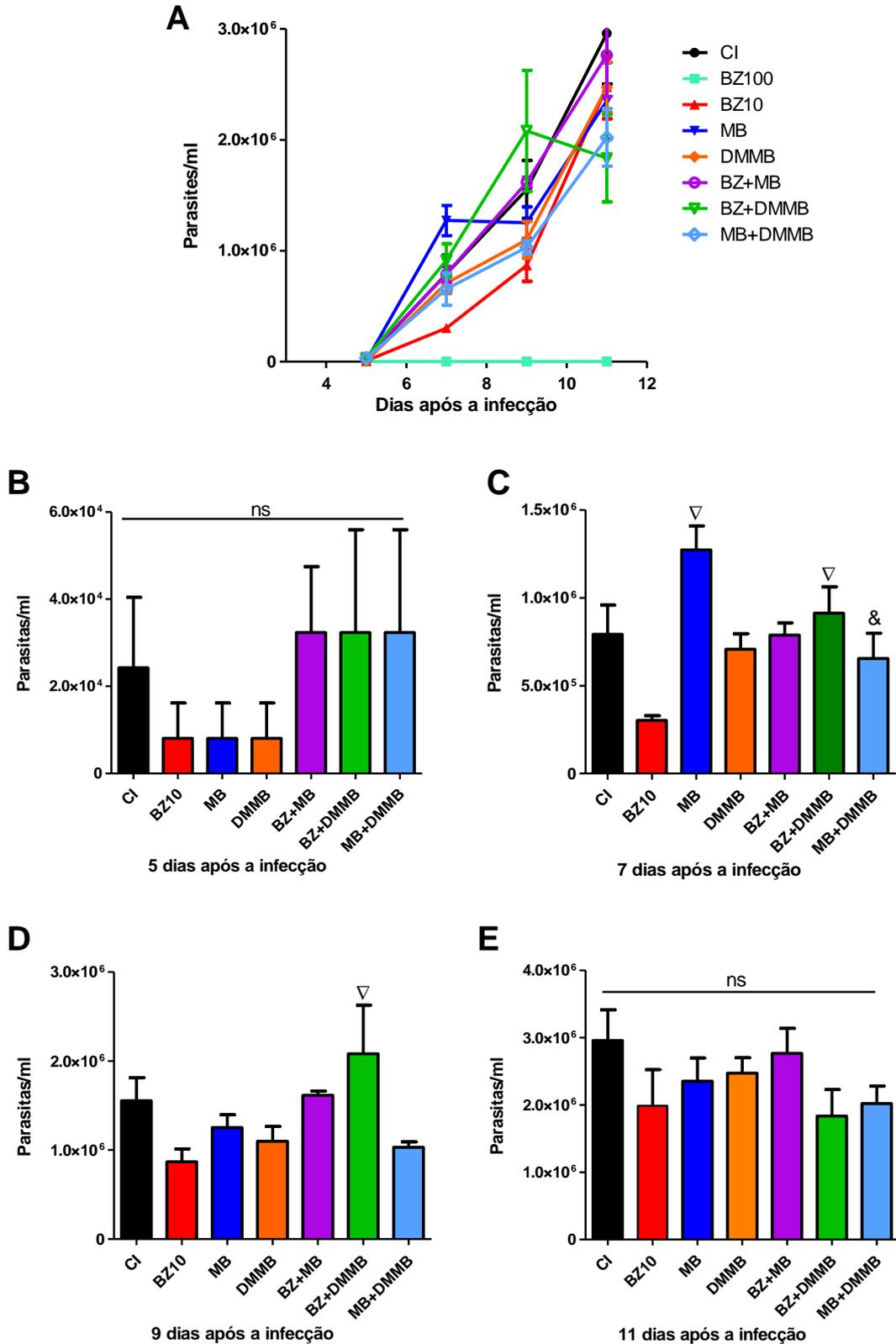
4.2 Resultados *in vivo*

4.2.1 Parasitemia

A contagem dos parasitos na amostra de sangue dos camundongos foi realizada no 5º, 7º, 9º e 11º dia após a infecção para quantificação do número de parasitos por mL de sangue, em função do tempo (Figura 8). Nenhum parasito foi identificado no sangue dos animais tratados com BZ na dose clínica experimental (100 mg/Kg) (Figura 8.A).

Figura 8. Evolução da parasitemia de camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com benznidazol, azul de metileno e 1,9-dimetil-azul de metileno, isoladamente ou em combinação. A parasitemia foi avaliada no sangue periférico de camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no 5º, 7º, 9º, 11º após a infecção. A figura 8.A representa a parasitemia dos grupos avaliados no decurso da experimentação. Os gráficos para cada dia foram mostrados individualmente em 8.B; 8.C; 8.D e 8.E. (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes

de MB; (ns) não significativo.. Os resultados do presente trabalho foram avaliados por testes estatísticos com auxílio do software *GraphPad Prism*, com análise da média e erro padrão dos dados obtidos. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico One Way ANOVA post hoc Tukey ($p < 0.05$).

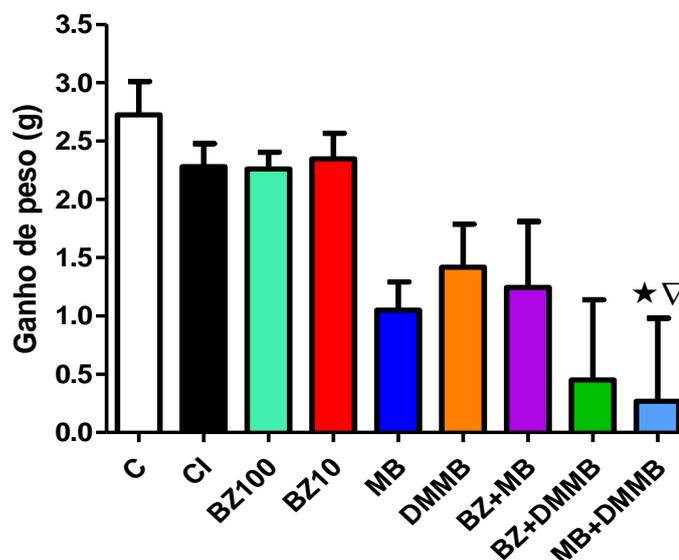


Os dados de parasitemia foram apresentados individualmente, para cada dia de infecção analisado, nas figuras 8.B, C, D e E. No gráfico 8.B (5º dia após a infecção) e 8.E (11º dia após a infecção) não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. No entanto, no 7º e 9º dia evidenciou-se um aumento significativo de tripomastigotas circulantes no grupo tratado por BZ+DMMB em comparação a BZ10 (* $p < 0,05$). A concentração de tripomastigotas no sangue de camundongos foi três e quatro vezes maior para MB do que nos grupos tratados com a combinação MB+DMMB (* $p < 0,05$) e BZ10 (** $p < 0,001$), respectivamente. Não houve diferença estatística dos grupos experimentais para o CI em nenhum dos dias analisados.

4.2.2 Peso dos animais

O peso dos animais foi obtido no primeiro e último (pré-morte) dia após a infecção para monitorar possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos propostos. Os dados do ganho de peso de cada grupo experimental estão apresentados na Figura 9.

Figura 9. Ganho de peso dos animais em experimentação na fase aguda da infecção. Os dados do peso de cada animal foram obtidos no primeiro e último (pré-morte) dia após a infecção e a diferença entre o peso final e inicial, corresponde ao valor do ganho de peso de cada grupo após dez dias de tratamento. Na figura foram demonstrados média \pm EPM do ganho de peso de cada grupo ($n=5$ /grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (▽) grupos estatisticamente diferentes de BZ10. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$).



Os animais tratados com os fenotiazínicos, combinados ou não ao benznidazol, tiveram menor ganho de peso, principalmente quando comparados com ao C e BZ10. No entanto essa diferença foi significativa apenas para o grupo tratado com MB+DMMB (* $p < 0.05$).

4.2.3 Análise do Parasitismo tecidual por qPCR

Uma parte do coração de cada animal morto 12 dias após a infecção foi utilizado para quantificar o material genético de *Trypanosoma cruzi* por qPCR. A técnica é altamente sensível para quantificar a carga parasitaria tecidual e permite uma avaliação específica do potencial terapêutico de tratamentos durante a fase aguda de infecção (PROVIDELLO *et al.*, 2018).

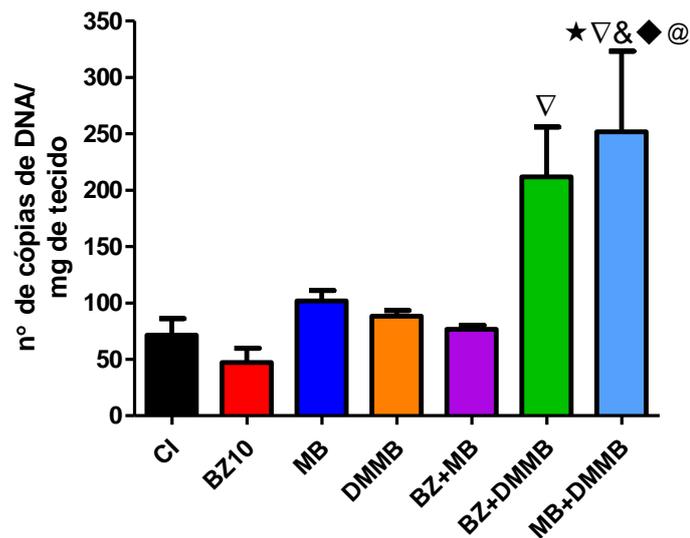
Uma curva-padrão com seis pontos foi elaborada a partir de uma triplicata da diluição seriada (1:10 – DNA: H₂O) do DNA extraído da cultura de epimastigotas. Cada ponto da curva de concentração conhecida permite calcular a quantidade de fitas de DNA presentes na amostra em função do Ct (do inglês, *cycle threshold*), que indica o número de ciclos necessários para o sinal fluorescente da amostra ser detectado. Os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico na amostra (ou seja, quanto maior o nível de Ct, menor é a quantidade de ácido nucleico amostra).

4.2.3.2 Quantificação de material genético de *Trypanosoma cruzi*

A quantificação do número de cópias do DNA de *Trypanosoma cruzi* por miligrama de tecido para cada grupo foram apresentados na Figura 10.

Figura 10. Quantificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostra de tecido cardíaco.

Na figura foram demonstrados a média \pm EPM da quantificação do DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostra de tecido cardíaco dos animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo) (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB (◆) grupos estatisticamente diferentes de DMMB; (@) grupos estatisticamente diferentes de BZ+MB Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico One Way ANOVA post hoc Tukey (p< 0.05).



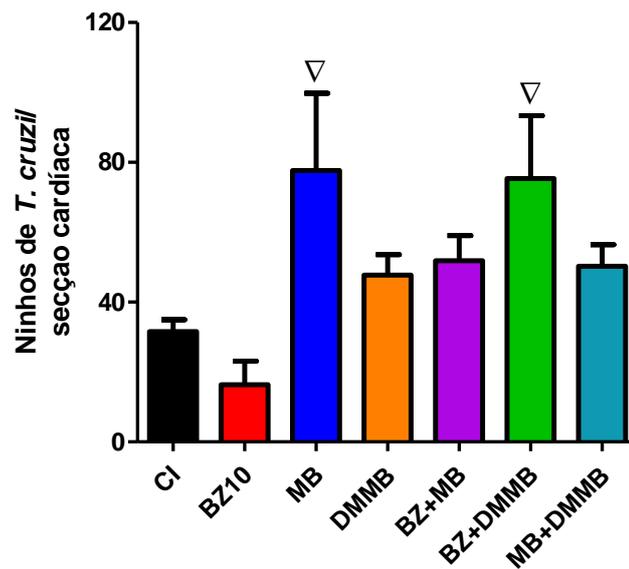
Os dados do controle sem infecção (C) e BZ100 não foram apresentados, pois ambos valores da quantificação foram próximos ou iguais a zero. Não houve diferença estatística entre os grupos, BZ10, MB, DMMB e BZ+MB e o CI. Embora, uma dose 10 vezes menor a dose clínica do BZ100 tenha promovido uma redução da carga parasitária em aproximadamente 33%, não houve diferença estatística entre BZ10 e CI.

Os grupos BZ+DMMB e MB+DMMB apresentaram maior concentração de DNA de *Trypanosoma cruzi* quando comparados aos outros grupos. A número de cópia de DNA do parasito em MB+DMMB foi estatisticamente maior que todos os grupos avaliados nesse trabalho, exceto BZ+DMMB. Para CI, BZ10 e BZ+MB essa diferença foi representado por $p < 0,01$ (**), para MB e DMMB $p < 0,05$ (*). A carga parasitária no tecido cardíaco após tratamento BZ+DMMB triplicou quando comparado ao grupo tratado com BZ10 (** $p < 0,01$).

4.2.4 Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco

Uma varredura completa de três secções (6 secções por lâmina) do tecido cardíaco de cada animal foi realizada para quantificação dos ninhos de amastigotas. A média das contagens de ninhos de cada animal foram determinadas para o cálculo da média dos grupos e os dados finais foram demonstrados na Figura 11.

Figura 11. Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco. Na figura foram demonstrados a Média \pm EPM da contagem de ninhos de amastigotas de três secções cardíacas para cada animal dos grupos em experimentação ($n=5$ /grupo). (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$).

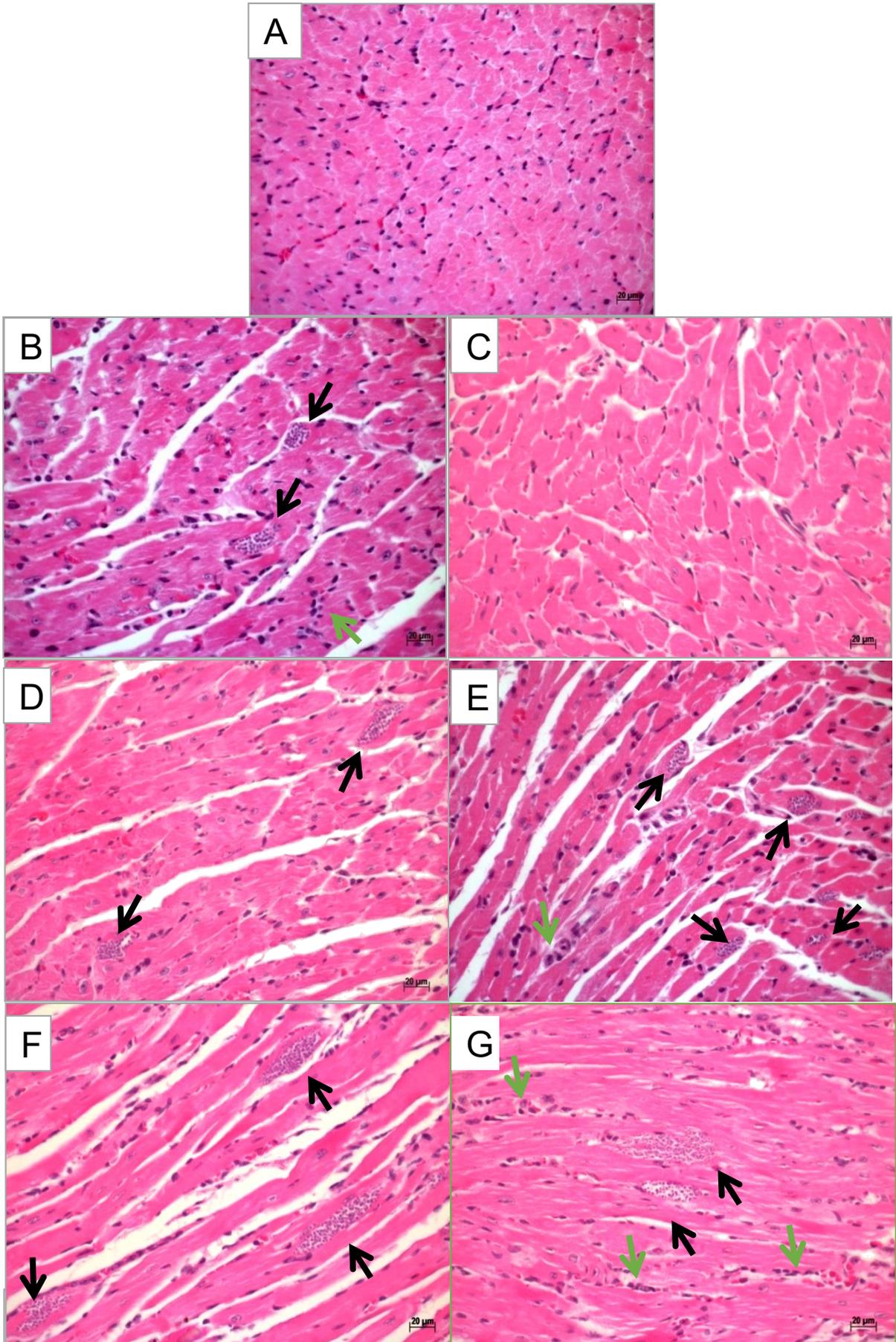


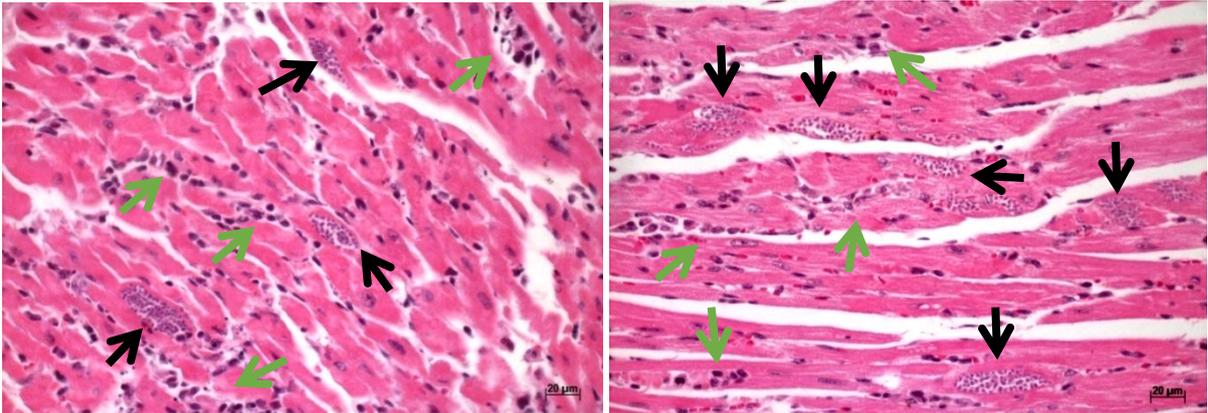
Os dados do controle sem infecção (C) e BZ100 não foram representados na tabela, pois não foram encontrados ninhos de amastigotas nas secções analisadas. Um aumento significativo do número de ninhos de amastigotas foi observado no tecido cardíaco dos grupos tratados com MB e BZ+DMMB (* $p < 0,05$) em comparação aos tratados com BZ10. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados para o CI.

4.2.5 Análise das secções do tecido cardíaco por microscopia

Subsequente a contagem de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco foram feitas fotomicrografias representativas de uma secção histológica de cada grupo. Nas imagens foi possível identificar ninhos de amastigotas nos grupos tratados com BZ10, MB, DMMB, BZ+MB, BZ+DMMB e MB+DMMB, exceto C (controle sem infecção) e no grupo tratado com BZ100. Nos grupos tratados com MB, BZ+MB e MB+DMMB foram identificados ninhos pequenos, porém em maior quantidade e esparsos em todas as secções avaliadas. Houve também a identificação de uma maior quantidade de infiltrado inflamatório no epicárdico desses grupos (imagens não mostradas). As imagens obtidas a partir do microscópio Axioscop 40 Zeiss® com câmera acoplada, em objetiva de aumento 40x e foram apresentadas na Figura 12.

Figura 12. Análise histopatológica do tecido cardíaco. Fotomicrografia representativa da secção cardíaca de cada grupo. Setas pretas indicam ninhos de amastigotas e setas verdes apontam para o infiltrado de células inflamatórias. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB.

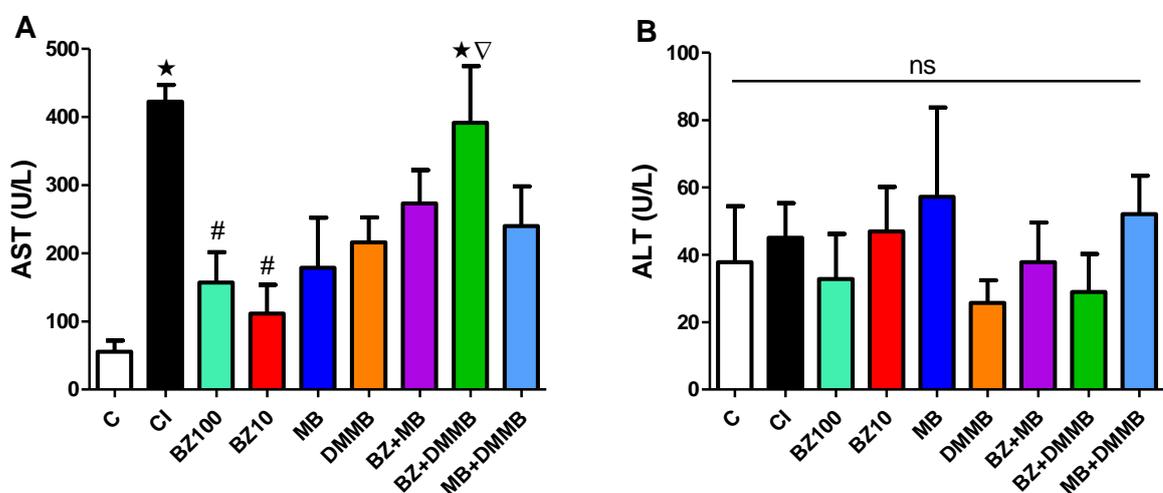




4.2.6 Avaliação de biomarcadores de função hepática

Enzimas hepáticas ALT e AST foram quantificadas a partir de amostra do plasma de cada animal para avaliação de alterações bioquímicas causados tanto pela infecção quanto pelo tratamento (Figura 13).

Figura 13. Quantificação plasmática dos níveis de AST, ALT. Na figura foram demonstrados média \pm EPM da dosagem dos parâmetros bioquímicos hepáticos para cada animal dos grupos em experimentação (n=5/grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (ns) não significativo. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$).



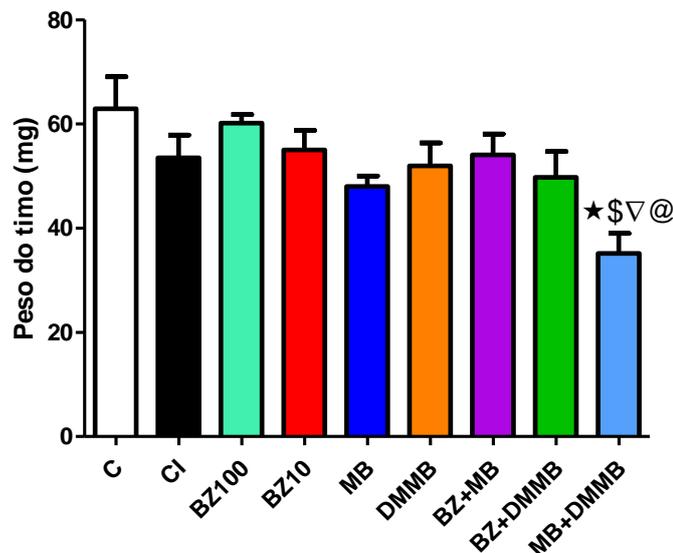
Os resultados mostraram que a concentração da enzima hepática ALT no plasma dos animais experimentais foram iguais a C para todos os grupos avaliados (Fig. 13.A e 13.B, respectivamente). No entanto, a concentração de AST foi aproximadamente quatro vezes maior

nos grupos CI e BZ+DMMB (** $p < 0,01$) quando comparado ao grupo C (Fig. 13.A). A dosagem dessa enzima nos grupos tratados com BZ100 e BZ10 foram iguais a C e estatisticamente menores que CI. Um aumento significativo de AST foi observado de BZ+DMMB quando comparados a BZ10.

4.2.7 Análise fenotípica das populações celulares no timo por citometria de fluxo

O peso do timo de cada animal foi obtido antes do ensaio experimental para obtenção das células tímicas. O peso do timo do grupo tratado com MB+DMMB foi estatisticamente menor que aqueles dos grupos C, BZ100, BZ10, BZ+MB. Em porcentagem, a redução do órgão foi de aproximadamente 45% e 34% quando comparado ao grupo C e CI (** $p < 0,01$), respectivamente. Para BZ10 e BZ+MB essa diferença foi representada por $p < 0,05$ (*). Embora, uma redução de 15% do tamanho do timo tenha sido observada no CI, não houve diferença estatística em relação ao C. Os resultados foram apresentados na figura 14.

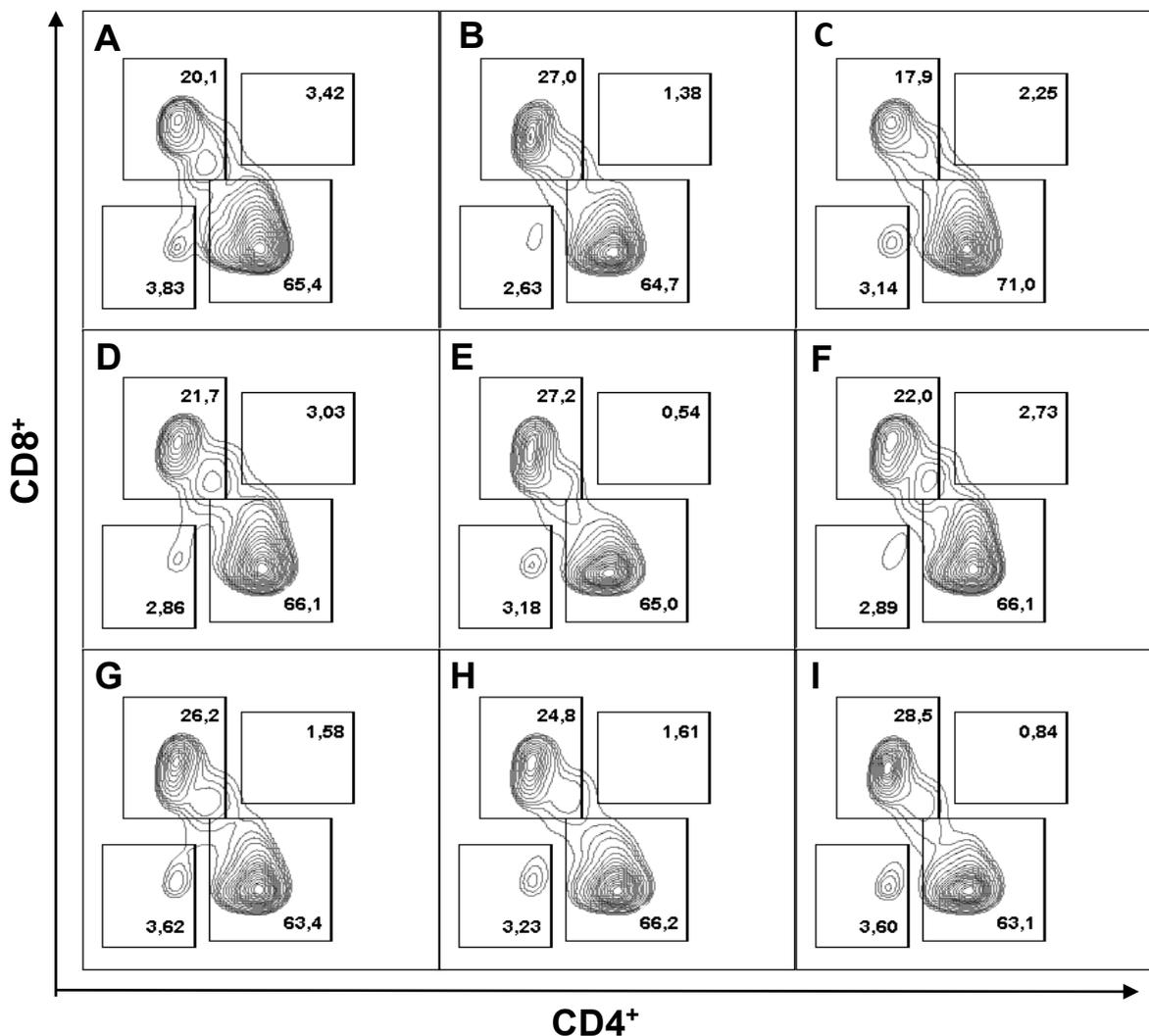
Figura 14. Peso do timo dos animais em experimentação. Na figura foram demonstrados média \pm EPM do peso do timo de cada animal dos grupos em experimentação ($n=5$ /grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (\$) grupos estatisticamente diferentes de BZ100; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (@) grupos estatisticamente diferentes de BZ+MB. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$).

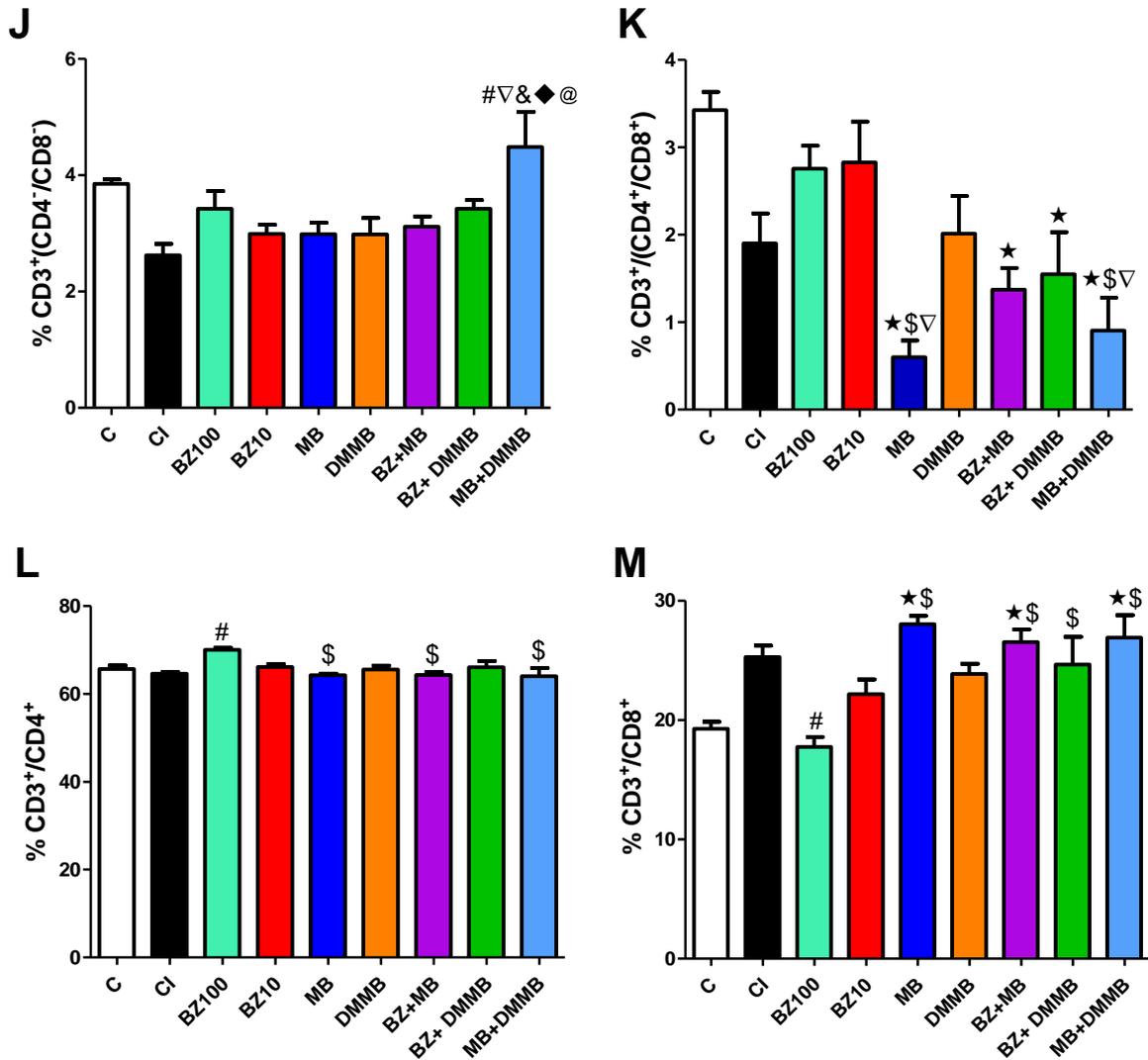


A porcentagem de linfócitos T no timo foi determinada após marcação das populações com anticorpos monoclonais específicos, seguida de identificação por citometria de fluxo. A estratégia de aquisição da população linfocitária foi determinada de acordo com o tamanho e

expressão de CD3. Na figura 15 estão representadas a frequência média da população tímica entre os animais de cada grupo analisado.

Figura 15. Análise fenotípica das populações celulares no timo por citometria de fluxo. Aquisição da população de linfócitos de acordo com as características de complexidade e expressão de CD3, D4 e CD8; (A) a (I), Imagem representativa das subpopulações de linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J a M) Média \pm SEM da frequência das populações parentais de linfócitos entre os animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (\$) grupos estatisticamente diferentes de BZ100; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB; (◆) grupos estatisticamente diferentes de DMMB; (@) grupos estatisticamente diferentes de BZ+MB; Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* (p< 0.05)





A análise fenotípica das populações células T do timo mostrou que 12 dias após a infecção ocorreu um aumento significativo da frequência da população duplo negativa (DN) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ no grupo tratado com MB+DMMB em comparação aos grupos CI (**p<0,01), BZ10, MB, DMMB e MB+BZ10 (*p<0,01). Em contrapartida, uma diminuição significativa da população duplo positiva (DP) CD3⁺CD4⁺CD8⁺ foi observado nos grupos tratados com MB e MB+DMMB em relação a C (**p<0,001), BZ100 e BZ10 (**p<0,01). A frequência dessa população também foi reduzida após o tratamento com BZ+MB e BZ+DMMB (*p<0,01), porém apenas em relação ao controle sem infecção (C).

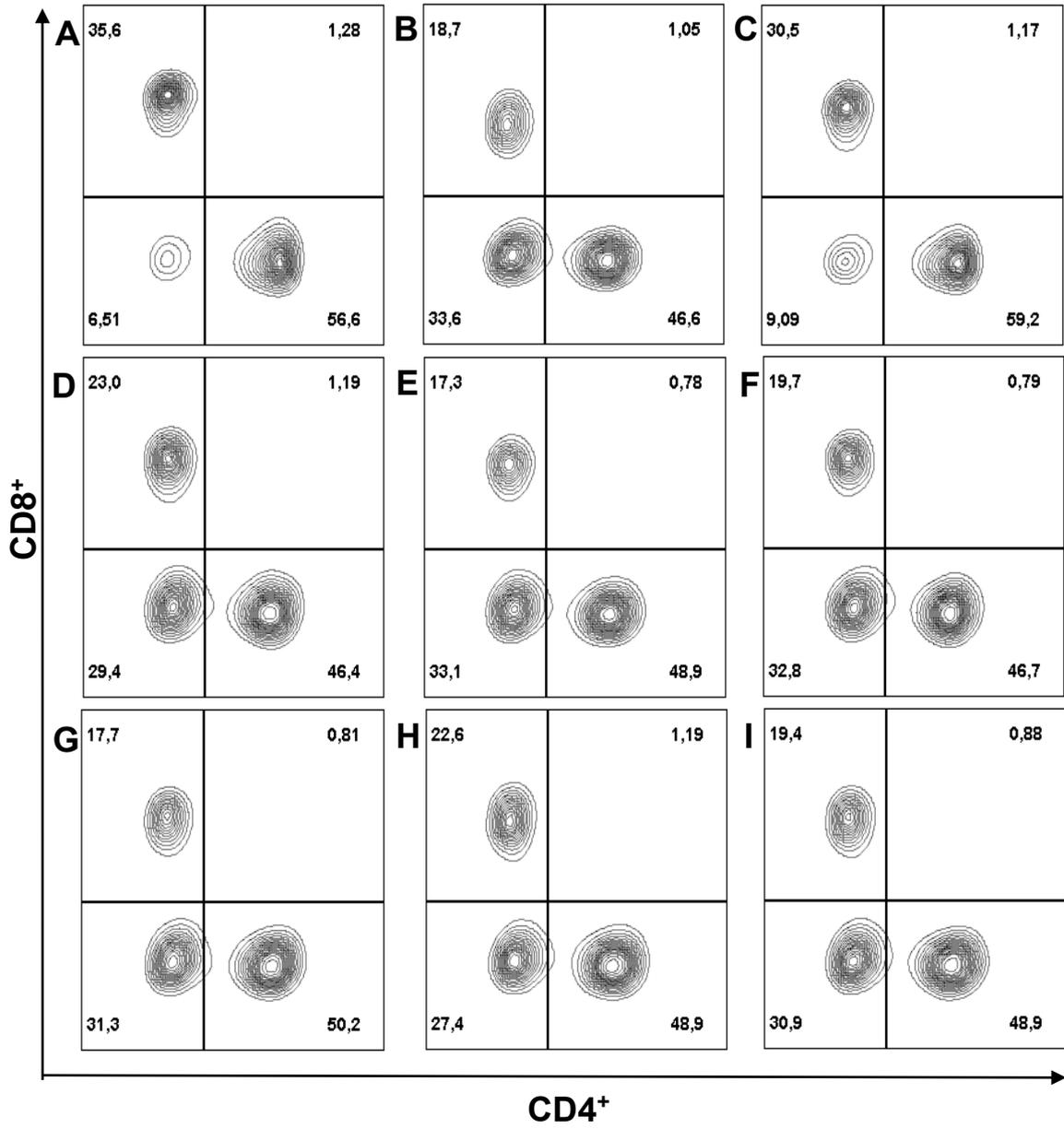
Uma diminuição da frequência de linfócitos T simples positivos (SP) CD3⁺CD4⁺ no timo foram observadas nos grupos CI (*p<0,05), MB, BZ+MB e MB+DMMB (**p<0,01) quando comparados a BZ100, embora essas populações tenham sido estatisticamente iguais ao controle sem infecção. Em contrapartida, a frequência de linfócitos T SP CD3⁺CD8⁺ foi maior

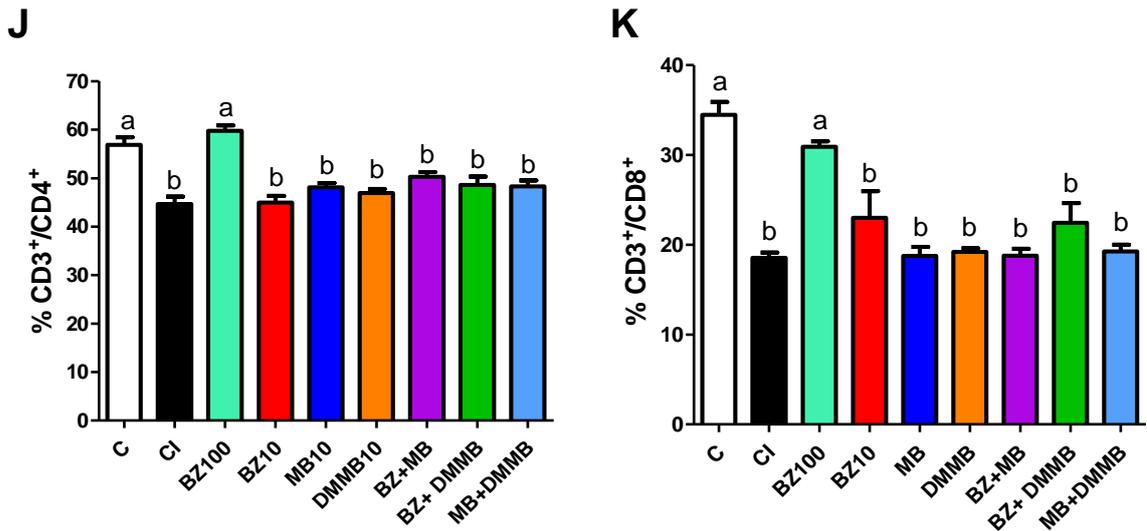
nos grupos MB (** $p < 0,01$), BZ+MB e MB+DMMB ($*p < 0,05$), quando comparados ao C e BZ na dose de 100mg/kg.

4.2.8 Análise fenotípica das populações celulares no baço por citometria de fluxo

A porcentagem de linfócitos, células dentífricas e macrófagos no baço foram determinadas após marcação das populações com anticorpos monoclonais específicos, seguida de identificação por citometria de fluxo. As populações de linfócitos no baço foram determinadas por complexidade e expressão de CD3, CD4 e CD8. As APCs foram determinadas pela expressão de moléculas do MHC de classe II e marcadores F4/80 positivos para macrófagos e CD11c para células dendríticas. Na Figura 16 abaixo estão representadas a porcentagem médias das populações celulares avaliadas e imagem representativa de cada grupo.

Figura 16. Análise fenotípica das populações de linfócitos no baço por citometria de fluxo. Aquisição das populações do baço de acordo com as características de complexidade e expressão CD3, D4 e CD8; (A) a (I) Imagem representativa das subpopulações de linfócito CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de um animal de cada grupo. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J e K) Média \pm SEM da frequência das populações parentais de linfócitos entre os animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo). Os dados representados pela letra (a) são estatisticamente diferentes de (b). Os resultados para cada grupo experimental foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0,05$).

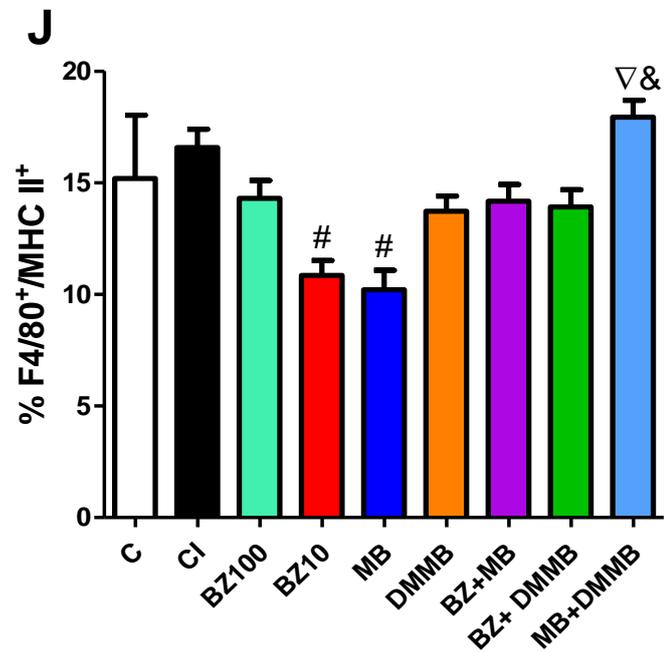
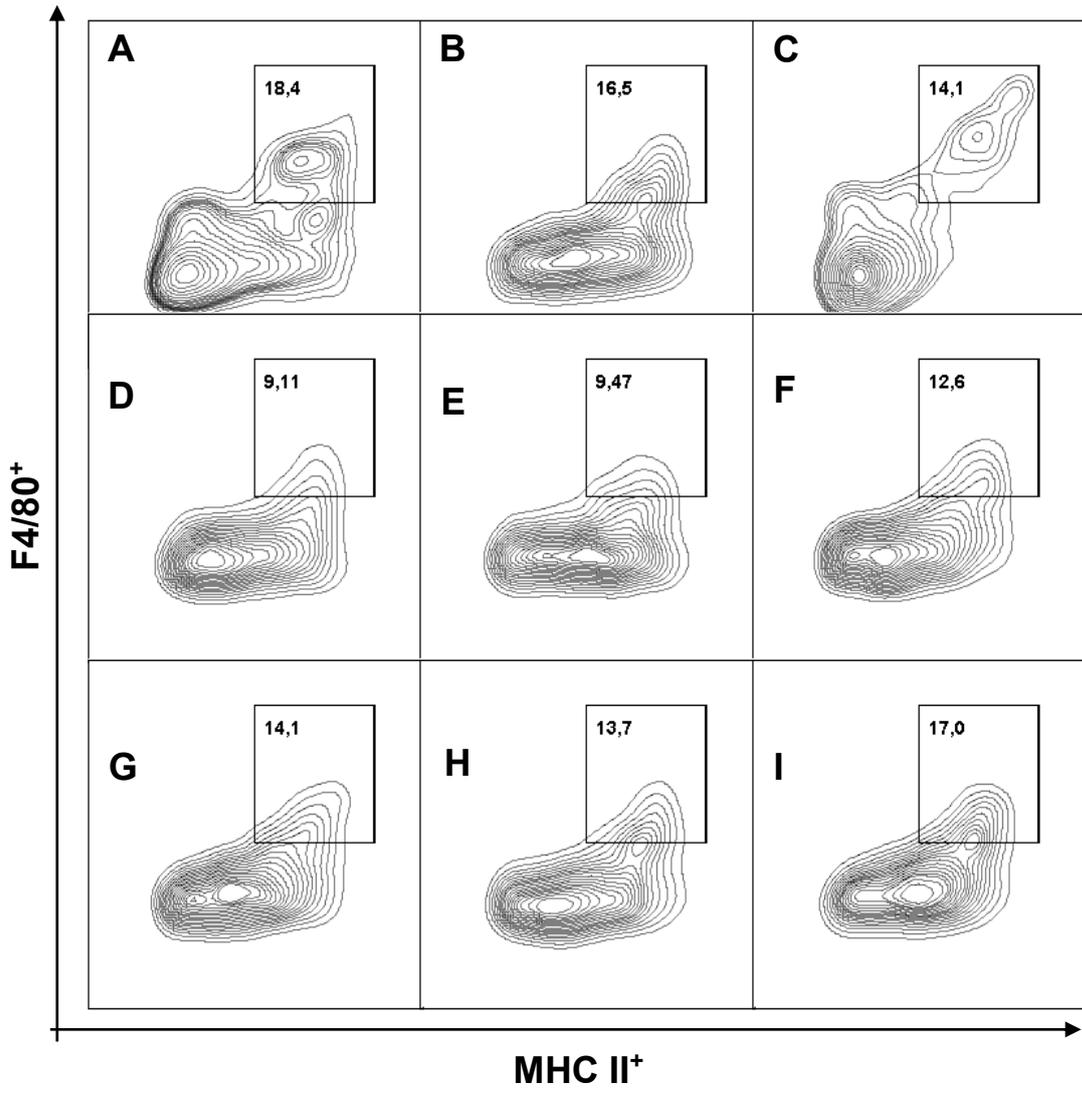




Uma redução significativa de todas as populações de linfócitos T auxiliares e citotóxicos foi observada em relação ao tratamento com BZ100 e C. Para a população SP CD4⁺ houve uma redução de aproximadamente 20% na frequência das populações nos grupos CI, BZ10 e DMMB (**p<0,001) e 15% para as demais MB, BZ+MB, BZ+DMMB e MB+DMMB (*p<0,01). A frequência da população SP CD8⁺ foi reduzida em aproximadamente 50% para CI, DMMB, BZ+MB e MB+DMMB (**p<0,001) e 30% para BZ10 e BZ+DMMB (**p<0,01).

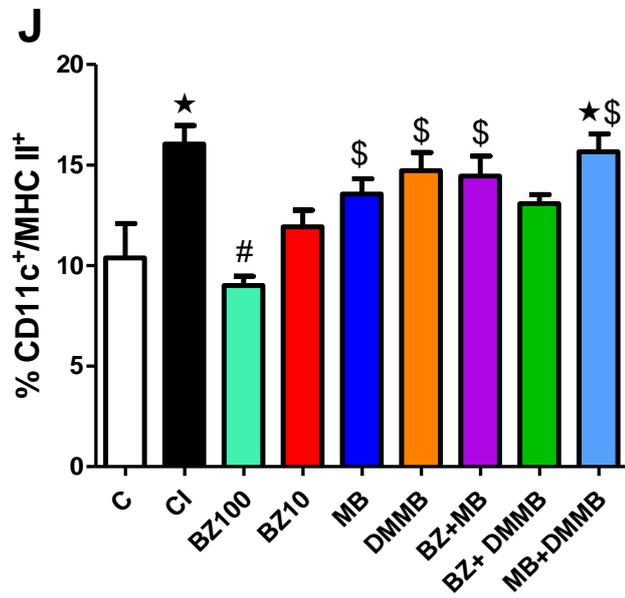
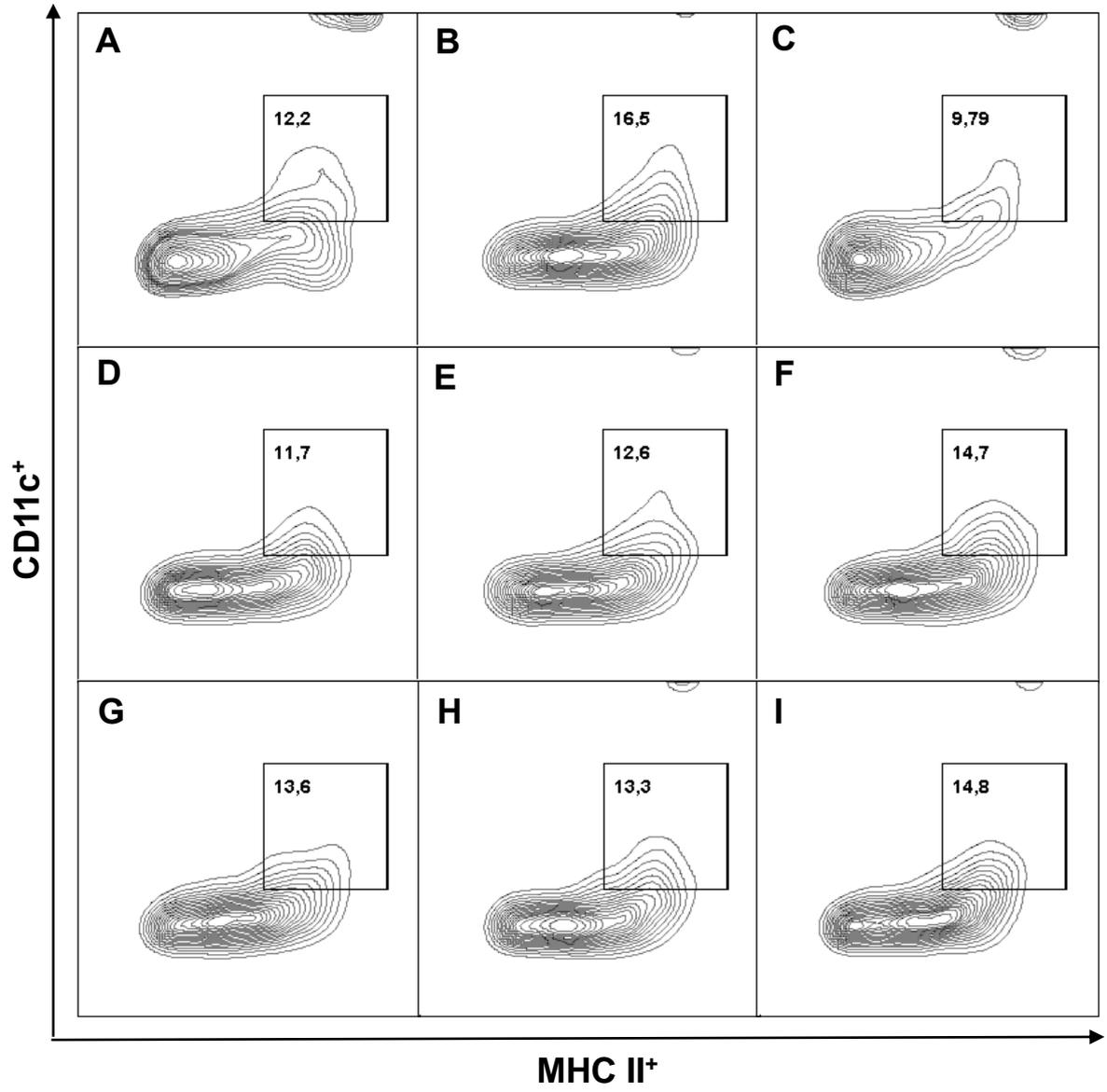
Uma redução de 5% foi observada na população de macrófagos (F4/80⁺MHCII⁺) nos animais tratados com BZ10 e MB10 em relação ao CI e MB+DMMB. No entanto, a frequência dessa população em todos os grupos não foi alterada quando comparados ao controle sem infecção (C) (Figura 17).

Figura 17. Análise fenotípica das populações de macrófagos no baço por citometria de fluxo. Aquisição das populações do baço de acordo com as características de complexidade e expressão MHCII e F4/80; (A) a (I) Imagem representativa das subpopulações de macrófago MHCII⁺F4/80⁺ de um animal de cada grupo. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J) Média ± SEM da frequência das populações parentais macrófagos entre os animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo). (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (∇) grupos estatisticamente diferentes de BZ10; (&) grupos estatisticamente diferentes de MB. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* (p< 0.05).



A população de células dendríticas no baço ($CD11c^+MHCII^+$) foi maior para o CI e MB+DMMB (** $p < 0,01$) em relação ao controle não infectado (C), que em porcentagem representa um aumento de aproximadamente 6%. A população dessas células dendríticas também aumentaram após tratamento com MB, DMMB BZ+MB, mas não houve diferença estatística desses grupos para (C), somente para o grupo tratado com BZ100 (Figura 18).

Figura 18. Análise fenotípica das populações de células dendríticas no baço por citometria de fluxo. Aquisição das populações do baço de acordo com as características de complexidade e expressão MHCII e CD11c; (A) a (I) Imagem representativa das subpopulações de células dendríticas $MHCII^+CD11c^+$ de um animal de cada grupo. (A) Grupo C; (B) Grupo CI; (C) Grupo BZ100; (D) Grupo BZ10, (E) Grupo MB, (F) DMMB, (G) Grupo BZ+MB, (H) Grupo BZ10+DMMB, (I) Grupo MB+DMMB. (J) Média \pm SEM da frequência das populações parentais de células dendríticas entre os animais de cada grupo em experimentação (n=5/grupo). (★) grupos estatisticamente diferentes de C; (#) grupos estatisticamente diferentes de CI; (\$) grupos estatisticamente diferentes de BZ100. Os resultados experimentais foram analisados pelo teste estatístico *One Way ANOVA post hoc Tukey* ($p < 0.05$).



5. DISCUSSÃO

A pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas ainda é uma missão desafiadora, mesmo cento e dez anos após a descrição da doença pelo médico Carlos Chagas. O BZ e o NFX são eficazes no tratamento de crianças e adultos jovens nos estágios iniciais da doença, mas falham em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica avançada (MORILLO *et al.*, 2015). As alterações cardiovasculares imunomediadas como consequência da persistência parasitária no tecido cardíaco são os principais responsáveis pelas altas taxas de mortalidade de pacientes sintomáticos na fase aguda e crônica de infecção (RASSI Jr *et al.*, 2009).

A aprovação do uso de um novo medicamentos em humanos pode demorar muitos anos e depende de inúmeros fatores como, ter baixo custo, não causar efeitos adversos e ser capaz de curar os pacientes independentemente do estágio de infecção (PLANER *et al.*, 2014). No entanto, a grande complexidade da interação parasito-hospedeiro e a diversidade genética entre as cepas de *Trypanosoma cruzi* corroboram com falha terapêutica do estudo de novos compostos, principalmente em ensaios clínicos (ZINGALES *et al.*, 2014; PAUCAR *et al.*, 2016).

Nesse contexto, parece atraente investigar uma segunda indicação terapêutica para medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, principalmente para doenças negligenciadas. Atualmente, o MB é aprovado no tratamento de várias doenças, como a metemoglobinemia adquirida e hereditária, na prevenção de infecções do trato urinário e principalmente na malária (LU *et al.*, 2018). Alguns estudos têm demonstrado o potencial de MB para outros protozoários como *Leishmania sp* e *Trypanosoma cruzi*. Embora tenha um efeito pleiotrópico, a produção de ERO e substâncias tóxicas para os parasitos parece ser um dos principais mecanismos de ação do MB nesses protozoários (GIRONES *et al.*, 2006; BAPTISTA E WAINWRIGHT, 2011; Lu *et al.*, 2018). É importante citar, que os fenotiazínicos são compostos sintéticos de baixo custo, fácil obtenção e produção em larga escala. As evidências do múltiplo potencial terapêutico do MB fundamentaram o objetivo pioneiro desse trabalho de explorar o efeito dessa classe de substâncias na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em protocolos *in vitro* e *in vivo*.

Um estudo recente sugere que as formas amastigotas intracelulares desempenham um papel chave na persistência parasitária na fase crônica da infecção e podem sobreviver no hospedeiro mamífero em um estado dormente inconspícuo à resposta imune e inativo ao BZ (FERNANDES E ANDREWS, 2012; Sanchez-VALDEZ *et al.*, 2018). Portanto, a ação direta

dos fenotiazínicos sobre as formas intracelulares foi investigada. Supreendentemente, MB e derivados foram capazes de inibir a proliferação das formas amastigotas em concentrações nanomolares, exceto o composto sintético DO37 que apresentou $IC_{50}=1.805 \pm 1.15 \mu M$. DMMB e NMB apresentaram valores de IC_{50} menores que 100nM e foram 36 e 39 vezes mais ativos que o BZ, respectivamente (Tabela 7).

A inibição parasitária é um importante fator a ser considerado na triagem de substâncias *in vitro*, mas os resultados devem ser comparados aos valores de citotoxicidade e SI, que juntos irão compor uma previsão de possíveis efeitos colaterais em estudos preliminares *in vivo*. As substâncias estudadas devem ser capazes de atravessar a membrana plasmática e agir sobre os organismos intracelulares sem danificar ou lisar células hospedeiras. Exceto, DO 16 e DO37, as substâncias apresentaram toxicidade moderada, mas valores de SI superiores a 10, como preconizado para ensaios de triagem de substâncias anti-*T. cruzi*.

Há mais de vinte anos, Vennerstrom e colaboradores mostraram efeito do fenotiazínicos comerciais em duas cepas de *P. falciparum* resistentes a Mefloroquinina em estudos *in vitro* (VENNERSTROM *et al.*, 1995). Todos os corantes apresentaram atividade inibitória para o parasito em concentrações inferiores a 100 nanomolar, principalmente MB e TBO. MB e TBO apresentaram IC_{50} inferiores a 20nM e foram mais ativos que o fármaco Cloroquina, utilizado por muitos anos para tratamento da malária. Estruturalmente, a presença de dois grupos metil (CH_3) em NMB e DMMB no anel tiazina diminuiu o potencial antimalárico desses corantes em relação a MB e TBO. Inversamente, os resultados do presente trabalho mostraram que esses grupos funcionais parecem ser importantes para potencializar os efeitos de NMB e DMMB sobre as formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, embora um aumento da citotoxicidade também tenha sido observada.

Alguns estudos demonstram que lipofilicidade é um importante fator a ser considerado no transporte de fármacos pela membrana plasmática (VAN DE WATERBEEMD *et al.*, 2001; SCHERRMANN, 2002; VOLPE, 2016). Morak-Młodawska e colaboradores demonstraram que substituintes alifáticos, como metila ou alila, aumentam a lipofilicidade de fenotiazínicos e o potencial contra células cancerosas (MORAK-MLODAWSKA *et al.*, 2015). Da mesma maneira os grupamentos metil parecem contribuir para um aumento da biodisponibilidade em NMB e DMMB no meio intracelular para atuarem de maneira mais efetiva contra as formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

A inserção de anéis heterocíclicos piridina nos análogos de MB mudaram consideravelmente a atividade biológica *in vitro*. Dois grupos piridinas no análogo DO15 provocaram um aumento da atividade tripanocida, embora um aumento da toxicidade para a

célula hospedeira tenha sido observada. Não houve diferença na atividade biológica entre os compostos funcionalizados com um anel piridina, DO16 e DO43, quando confrontados aos dados de MB. Interessantemente, uma amina heterocíclica em DO37 reduziu em duas ordens de grandeza a atividade desse composto sobre as formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* quando comparados ao análogo DMMB (Tabela 7).

Nos últimos anos, a utilização do MB em combinação com outras substâncias antimaláricas tem sido encorajada, principalmente como estratégia terapêutica no controle de resistência aos fármacos disponíveis. A ação de MB como um substrato para o sistema redox da GR leva a uma grande produção de ERO e substâncias tóxicas para o parasito, que estará sensibilizado a ação de outros antimaláricos (SCHIRMER *et al.*, 2003; COULIBALY *et al.*, 2009). Em um estudo clínico, a terapia combinada de artesunato, amodiaquina e azul de metileno foi mais eficiente que o tratamento padrão com artesunato-amodiaquina no controle da infecção malárica em crianças (COULIBALY *et al.*, 2015). Outros estudos clínicos também têm mostrado que a terapia combinada pode ser bastante efetiva no controle da infecção, principalmente nos países endêmicos (ZOUNGRANA *et al.*, 2008; COULIBALY *et al.*, 2009).

Alguns estudos sugerem que flavoenzimas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* possam ser alvos da ação de MB, já que tripanossomatídeos não possuem o sistema glutaciona/glutaciona redutase, mas um sistema equivalente representado pelas enzimas tripanotina/trypanotiona reductase (BUCHHOLZ *et al.*, 2008; FLOHE, 2012; BEIG *et al.*, 2015). Boda e colaboradores, mostraram que o MB apresentou forte atividade para a tripanossomíases africana. A ação de MB foi capaz de inibir as formas tripomastigotas em concentrações nanomolares, dados semelhantes ao obtidos nesse presente trabalho para as formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀= 420 nM). Os valores de IC₅₀ foram de 240±69 nM e 190±56 nM para *T. B. gambiense* e *T. b. brucei*, respectivamente (BODA *et al.*, 2006)

Para explorar a capacidade sinérgica de MB no tratamento da malária, protocolos combinados entre os fenotiazínicos comerciais e BZ foram investigados contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em protocolos *in vitro*. Curiosamente, o BZ parece interferir na potencialidade dos corantes comerciais, uma vez que as diferentes combinações entre essas duas classes de compostos foram antagônicas, inversamente ao efeito sinérgico observado para todas as combinações dentre os fenotiazínicos, exceto pelo efeito aditivo entre MB+DMMB. O mecanismo de ação das substâncias *in vitro* não foi estudado nesse trabalho, mas é possível que o efeito antagônico esteja relacionado ao metabolismo das substâncias que é dependente do ciclo redox mediadas por NADH e tióis (HALL E WILKINSON, 2012; BEIG *et al.*, 2015).

Substâncias que atuam no desbalanço oxidativo do parasito como o BZ e NFX ou aqueles inibidores de vias bioquímicas ou enzimas importantes na manutenção da viabilidade parasitária, tem sido os mais promissores nos estudos *in vitro* (SCARIM *et al.*, 2018). No contexto atual, parece inevitável propor regimes terapêuticos em combinação com as substâncias de referência BZ e NFX, independentemente se a pesquisa envolve desenvolvimento de novos medicamentos ou uma segunda indicação para aqueles já existentes.

Diversos trabalhos exploraram o potencial antimalárico de MB, mas o papel dele na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ainda é inexplorado (SCHIRMER *et al.*, 2003; GIRONES *et al.*, 2006; ZOUNGRANA *et al.*, 2008; COULIBALY *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2018). Portanto, fundamentado nos resultados *in vitro* desse trabalho, MB e DMMB foram investigados, isoladamente ou em combinação com BZ, durante a fase aguda de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Embora, o efeito da combinação de MB+DMMB tenha sido aditivo, DMMB foi selecionado para os estudos *in vivo*, por apresentar maior atividade sobre as formas amastigotas quando comparados aos outros sete fenotiazínicos.

A parasitemia é um parâmetro rápido e eficiente para prever o potencial terapêuticos de novos medicamentos em camundongos experimentalmente infectados. A infecção é subpatente no início da infecção, mas pode ser facilmente monitorada pelo aumento da carga parasitária sanguínea que geralmente ocorre, entre os dias 7 e 13 após infecção dependendo da cepa e inóculo administrado. Consequentemente, a supressão da parasitemia representa um bom indicativo do potencial de substâncias *in vivo* na fase aguda da infecção (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Os regimes terapêuticos propostos nesse trabalho não foram capazes de reduzir ou eliminar o parasito no sangue de camundongos em nenhum dos dias avaliados, apesar de diminuir a parasitemia nos grupos tratados com BZ10. Outros trabalhos já mostraram uma redução de 30 a 40% no número de tripomastigotas após tratamento com BZ na dosagem de 10 mg/kg quando comparados ao controle infectado (BAHIA *et al.*, 2014; PROVIDELLO *et al.*, 2018). É importante citar que essa dosagem foi utilizada para não haver supressão completa da parasitemia e permitir uma múltipla comparação entre as combinações de substâncias para determinação do sinergismo *in vivo*.

Nesse sentido, os dados demonstram que a terapia combinada não foi capaz de reduzir a parasitemia quando comparados ao CI. Quando combinados ao BZ a MB ou DMMB parece não exercer função alguma no controle da infecção quando comparados a monoterapia. Curiosamente, no sétimo dia após a infecção um aumento considerável no número de

tripomastigotas circulantes foi observado no grupo tratado com MB, principalmente quando comparados a BZ10 e MB+DMMB.

Durante a fase aguda, os tripomastigotas circulantes podem migrar para diferentes órgãos do hospedeiro e invadir qualquer tipo de células nucleadas no hospedeiro, mas a patogênese da doença está relacionada principalmente a invasão da musculatura cardíaca e esquelética (RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012). Portanto, a quantificação do DNA do parasito no tecido cardíaco e análise histológica dos animais foram investigadas para explorar os efeitos dos tratamentos no controle da invasão tecidual.

A alta sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar DNA de *Trypanosoma cruzi* em diferentes tipos de amostras expandiu as possibilidades para o diagnóstico da infecção em diferentes contextos clínicos e epidemiológicos (BRITTO *et al.*, 1995; WINCKER *et al.*, 1997; SCHIJMAN *et al.*, 2011). No entanto, sabe-se que o uso dessa técnica como diagnóstico clínico é aceitável somente quando combinada a outras técnicas, principalmente pela intermitência de *Trypanosoma cruzi* na corrente sanguínea no curso da infecção (BALOUZ *et al.*, 2017).

Atualmente o PCR tem sido bastante explorado como uma ferramenta para indicar falha terapêutica em estudos experimentais e clínicos, pela capacidade de identificar quantidades mínimas de DNA de *Trypanosoma cruzi* tanto em amostras sangue quanto em tecidos alvo quando os tratamentos não são capazes de controlar a infecção (MARIN-NETO *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2013). A combinação de BZ+DMMB aumentou significativamente a concentração de DNA de *Trypanosoma cruzi* no tecido cardíaco em relação a monoterapia com BZ10 e DMMB (Figura 10). Esses dados fundamentam um antagonismo entre as substâncias também observado no 7º e 9º dia após a infecção, embora nenhuma diferença estatística tenha sido identificada entre DMMB e BZ+DMMB (Figura 8).

Como a extração de DNA é feita a partir de uma porção mínima do tecido cardíaco, uma varredura completa dos ninhos de amastigotas em três secções histológicas foram realizadas para confirmar essa hipótese. Embora, nenhuma diferença estatística tenha sido observada de MB e BZ+DMMB para o CI pelo método de qPCR (Figura 10), um aumento significativo do parasitismo tecidual nesses grupos corrobora com o aumento de tripomastigotas sanguíneos no 7º dia após a infecção. Essas formas poderiam ter migrado em maior número para o tecido cardíaco durante essa fase, uma vez que no dia anterior a coletas dos órgãos (11 dias após a infecção) não houve diferença na concentração de tripomastigotas entre os grupos (Figura 8).

Os dados de histologia corroboram com os dados de parasitemia, qPCR e contagem de ninhos de amastigotas, que mostram um maior parasitismo e infiltrado inflamatório no tecido

cardíaco de animais tratados com BZ+DMMB e MB+DMMB, quando comparados ao CI. De forma interessante, esses grupos apresentaram maior quantidade de infiltrado inflamatório na região do pericárdio ao invés do miocárdio como demonstrado na literatura para camundongos infectados pela cepa Y (GIRONES *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2014). A inflamação miocárdica associada ao infiltrado mononuclear é um achado comum nos cortes histológicos na infecção pela doença de Chagas. A proximidade espacial de parasitos com o infiltrado inflamatório pode variar entre as diferentes cepas e modelos experimentais, mas não alteram o desfecho clínico e o comprometimento cardíaco no hospedeiro (GIRONES *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

O MB pode ser administrado via oral ou intravenosa em doses que variam de acordo com a patologia investigada (SCHIRMER *et al.*, 2011). A combinação de MB a fármacos antimaláricos é bem tolerado em doses inferiores a 25 mg/kg por via oral (LU *et al.*, 2018). A variedade de doses e vias de administração parecem estar relacionadas ao efeito hormético de MB, que apresenta melhor atividade biológica quando administrado em doses baixas (GABRIELLI *et al.*, 2004). Como o metabolismo de MB é dependente de enzimas mitocondriais, altas concentrações locais de MB poderia sequestrar elétrons dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e interromper o equilíbrio redox das mitocôndrias (VUTSKITS *et al.*, 2008; ROJAS *et al.*, 2012). Consequentemente, MB pode agir como um agente pró-oxidante e causar efeitos adversos como náuseas, vômitos, arritmias e alterações urogenitais já demonstrados no tratamento oral para a malária (LU *et al.*, 2018). Neste presente trabalho, uma dose inferior a 25 mg/kg de MB e DMMB foram administradas para evitar possíveis efeitos adversos *in vivo* que poderiam interferir no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ou na resposta biológica as terapias propostas.

As características físicas e fisiológicas dos camundongos estão frequentemente alteradas durante a fase aguda de infecção (CAMPOS *et al.*, 2016). Dentre as principais características a piloereção, hipotermia e a perda de peso pela redução do consumo alimentar são as mais importantes, principalmente nos dias posteriores ao pico de parasitemia (SILVA *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016). Embora, nenhuma diferença estatística tenha sido observada entre os grupos C e CI, o ganho de peso nos animais tratados com fenotiazínicos, combinados ou não, foi menor em relação aos outros grupos, mas a diferença foi mais acentuada para os animais tratados com MB, BZ+DMMB e principalmente para MB+DMMB, o que corrobora com os dados que mostram maior parasitismo no tecido cardíaco nesses grupos.

Embora, a musculatura cardíaca e esquelética sejam os principais alvos de *Trypanosoma cruzi*, todos os órgãos podem estar parasitados na fase aguda de infecção (SILVA *et al.*, 2012;

FRANCISCO *et al.*, 2016). Nesse contexto, alguns trabalhos mostraram que o processo inflamatório nos hepatócitos como consequência do parasitismo pode alterar a homeostase metabólica e a função das enzimas ALT e AST nesse órgão (ONOFRIO *et al.*, 2015; PENAS *et al.*, 2016; PROVIDELLO *et al.*, 2018). Além disso, a maioria dos fármacos atualmente disponíveis sofrem metabolismo por ação de enzimas específicas no fígado e alterações nesse órgão podem indicar hepatotoxicidade mediadas por fármacos (ZANGER E SCHWAB, 2013). A corroborar com os dados de Providello e colaboradores (PROVIDELLO *et al.*, 2018), um aumento significativo de AST foi observado no grupo CI em relação a C, da mesma maneira que não houve diferença estatística entre BZ10 e o C. Neste presente trabalho, o grupo tratado com BZ+DMMB mostrou alto níveis de AST quando comparados ao C, o que corrobora com o alto parasitismo sanguíneo e tecidual cardíaco nesses animais, embora nenhuma diferença na concentração de ALT tenha sido observada entre os grupos estudados.

Os resultados sugerem que os tratamentos com MB, BZ+DMMB e MB+DMMB aumentaram a carga parasitária sanguínea e tecidual de camundongos em fase aguda da infecção, principalmente quando comparados ao grupo infectado sem tratamento. A ação do sistema imunológico contra a infecção por *T. cruzi* representa um fator determinante nas manifestações clínicas da doença de Chagas no homem. Além de controlar a carga parasitária na fase aguda, a resposta imune pode determinar a evolução clínica do paciente durante da fase crônica. Nesse contexto, a função de órgãos e células específicas do sistema imune como, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T foram investigadas nesse trabalho.

A depleção de timócitos com consequente involução do timo tem sido relatada na infecção por diferentes patógenos e também pelo *Trypanosoma cruzi* (DE MEIS *et al.*, 2012; LEPLETIER *et al.*, 2013). Os mecanismos subjacentes a este fenômeno não são completamente elucidados, mas é provável que na fase aguda da infecção a resposta inflamatória mediada por TNF- α e níveis aumentados de esteroides adrenais, alterem o microambiente tímico e aumentem a susceptibilidade do hospedeiro a infecção (PEREZ *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2018) Esses dados corroboram com os achados desse trabalho que mostram uma involução de aproximadamente 45% no tamanho do timo nos animais tratados pela combinação MB+DMMB, que demonstraram parasitismo maior que o controle infectado, principalmente no tecido cardíaco. Em contrapartida, o timo de animais infectados diminuiu 15% em relação ao controle sem infecção, mas a diferença não foi significativa (Figura 14).

Alguns estudos demonstraram que a involução do timo é consequência principalmente da apoptose de timócitos duplo positivos (DP) CD4⁺CD8⁺ e aumento de produção de células T imaturas (DN) CD4⁺CD8⁻, que se tornam autoreativas ao não serem eliminadas pela seleção

negativa na região cortico-medular (PEREZ *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010; LEPLETIER *et al.*, 2013). Um aumento significativo de células T DN e diminuição de células T DP foram identificadas nos grupos tratados com MB+DMMB. A diminuição de célula T DP também foi identificada nos grupos CI, MB, BZ+MB, MB+DMMB, BZ+DMMB que demonstraram alto parasitismo sanguíneo e tecidual cardíaco, embora em menor grau para CI (Figura 15).

Durante o processo de maturação linfocitária, linfócitos DP são selecionados positivamente para tornarem-se moléculas maduras com um fenótipo simples positivas (SP) CD4⁺ ou CD8⁺, após um processo altamente rigoroso que seleciona apenas uma proporção mínima da população (LEE *et al.*, 2010). Embora os timócitos DP sejam alvos principal na infecção, a diferenciação para SP pode estar alterada (LEITE-DE-MORAES *et al.*, 1992).

Curiosamente, a frequência da população CD8⁺ está aumentada no timo para os grupos CI, MB, BZ+MB, MB+DMMB em relação ao controle sem infecção (Figura 15). Alguns estudos mostraram que os linfócitos T CD8⁺ representam a maioria das células mononucleares no infiltrado inflamatório de cardiomiócitos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (REIS *et al.*, 1993; LANNES-VIEIRA, 2003; SILVERIO *et al.*, 2012). Embora, esses linfócitos do infiltrado estejam ativados, o aumento de T CD8⁺ *naive* no timo poderia corresponder a maior demanda periférica com consequência da ativação da resposta Th1 e recrutamento de células T CD8⁺, que são especializadas em combater organismos intracelulares (BOSCARDIN *et al.*, 2010; SILVERIO *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2014). É importante citar, que o parasitismo do timo também poderia subverter a homeostase intratímica, assim como os estímulos para diferenciação das células SP (LEITE-DE-MORAES *et al.*, 1992). A corroborar com os dados acima, a demanda periférica de células especializadas no combate a infecção poderia justificar a diminuição dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no baço para a maioria dos grupos avaliados neste trabalho (exceto C e BZ100), uma vez que podem ser recrutados em órgãos linfoides periféricos ou mesmo nos locais de infecção.

A ativação e recrutamento de células T para o local da infecção é dependente de produção de citocinas e principalmente da expressão de moléculas MHC de classe I e II, e moléculas co-estimuladoras em macrófagos e células dendríticas (DCs) (BOSCARDIN *et al.*, 2010; NEEFJES *et al.*, 2011). Essas células desempenham papéis importante no controle da infecção chagásica, como o reconhecimento do patógeno, apresentação antigênica, além da produção de citocinas de caráter inflamatório. Como consequência, ocorre polarização de linfócitos para perfis de proteção, como os Th1 (*T helper 1*) com liberação de citocinas, como o IFN- γ , que contribuem para a eliminação do patógeno (CAMARGO *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2011). No modelo experimental aqui descrito, observou-se que os grupos BZ10 e MB

apresentaram diminuição significativa na frequência de macrófagos no baço quando comparados ao grupo CI, o que sugere a participação do MB na suscetibilidade a doença de Chagas experimental *in vivo* (Figura 17). Possivelmente, o tratamento com esse composto interfere na migração ou sobrevivência dessas células em tecidos de máxima importância para montagem de resposta imune.

Os dados desse trabalho corroboram com Boda e colaboradores que demonstram o forte potencial *in vitro* de MB, mas falha terapêutica após tratamento de camundongos infectados com *T. brucei* (BODA *et al.*, 2006). Os autores sugerem que em sistemas biológicos *in vivo* o azul de metileno pode ser reduzido por células endoteliais e ser transformado em metabolitos inativos pelos eritrócitos. Uma vez inativados, os compostos não agiriam em sistemas enzimáticos importantes do parasito. Para *Trypanosoma cruzi*, um processo de inativação poderia explicar a baixa atividade de DMMB *in vivo* uma vez que esse composto é análogo ao MB, mas não explicaria o aumento do parasitismo verificado nos grupos, combinados ou não a MB, quando comparados ao controle infectado.

Como discutido anteriormente, o sistema imune inato desempenha um papel fundamental no controle da fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* e na coordenação das respostas adaptativas (ANDRADE *et al.*, 2014). Dentre as moléculas de reconhecimento padrão (PPR), os inflamassomas desempenham uma importante função de reconhecimento e sinalização intracelulares para morte do parasito (GONCALVES *et al.*, 2013; PAROLI *et al.*, 2018). Inflamassomas são complexos multiproteicos da família NLR que induzem maturação de IL-1 β e IL-18, assim como morte celular mediada por caspase-1, conhecida como piroptose (JIN E FLAVELL, 2010).

Ahn e colaboradores demonstraram que MB atua como um agente anti-inflamatório com o bloqueio da expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β , que são componentes essenciais para a ativação do inflamassoma. Em contrapartida, tem sido demonstrado que NLRP3 e a protease efetora caspase-1 participam no controle da fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e animais nocautes para essas proteínas, exibiram um aumento da parasitemia (AHN *et al.*, 2017). Nenhuma via de ativação do inflamassoma foi estudada nesse presente trabalho, mas esse mecanismo poderia explicar ou indicar um possível caminho para o entendimento do aumento da parasitemia e alterações no perfil imunológico, principalmente para os animais tratados com MB e MB+DMMB. No entanto, essa hipótese deverá ser investigada em estudos posteriores.

Em suma, os resultados desse trabalho mostraram que exceto DO16 e DO37, todos os fenotiazínicos foram seletivos para as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em concentrações inferiores ao fármaco padrão BZ. NMB e DMMB foram os compostos mais

efetivos e são capazes de controlar a proliferação parasitária em concentrações inferiores a 100 nM nos protocolos *in vitro*. Esse efeito biológico é ainda potencializado quando ambos são combinados a TBO. A combinação entre os fenotiazínicos foi sinérgica para a maioria dos protocolos de tratamento, mas o efeito biológico foi maior entre NMB+TBO e TBO+DMMB.

Em contrapartida, camundongos experimentalmente infectados e tratados na fase aguda da infecção por MB+DMMB e principalmente MB e BZ+DMMB demonstraram maior parasitismo sanguíneo e tecidual cardíaco quando comparados ao CI. Assim, como nos resultados *in vitro*, o aumento da parasitemia entre BZ+DMMB parece estar relacionado ao antagonismo entre as substâncias, uma vez que BZ é capaz de controlar parcialmente a infecção e para a maioria dos parâmetros avaliados nesse trabalho, os grupos tratados com DMMB tiveram carga parasitária semelhante ao CI. De maneira interessante, o MB independentemente da combinação parece desempenhar ou interferir em funções importantes da resposta imune, principalmente no timo. A atrofia tímica e o aumentos da população DN parecem ser maiores na combinação de MB+DMMB. Da mesma maneira, um aumento das células DP, SP CD4+ e CD8+ foi evidenciado após tratamentos com MB, BZ+MB e principalmente MB+DMMB. Uma redução significativa da população de macrófagos após tratamento de MB em relação a CI e MB+DMMB indicam que esse fenotiazínico desempenhe uma importante função de bloqueio ou inativação das funções dessas células na resposta imune.

6. CONCLUSÃO

Esse presente trabalho trouxe uma proposta desafiadora e pioneira de avaliar dois corantes fenotiazínicos em protocolos experimentais de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Embora os resultados possam desencorajar a continuidade de pesquisas com MB e DMMB, um longo caminho ainda deve ser percorrido para entender a desconexão entre resultados *in vitro* e *in vivo*. Obviamente a complexidade de um sistema biológico oferece inúmeros obstáculos para o sucesso terapêutico de quaisquer compostos, principalmente para alvos intracelulares. Variações da dosagem, sistemas de proteção em nanopartículas, fotossensibilização dos compostos, assim como avaliação de parâmetros oxidativos e imunológicos aprofundados representam algumas das ferramentas disponíveis para compreender as interações dessas moléculas em sistemas biológicos. A considerar que o MB é um corante de baixo custo, fácil obtenção e utilizado para tratamento de diversas patologias, esse trabalho deve despertar o interesse para um estudo mais aprofundado para propor novas estratégias para o tratamento da doença de Chagas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F. et al. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. **Acta Trop**, Jul 2015.
- ABBAS, M. et al. Migrant and refugee populations: a public health and policy perspective on a continuing global crisis. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 7, p. 113, 2018.
- AHN, H. et al. Methylene blue inhibits NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasome activation. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12409, Sep 29 2017.
- ALARCON DE NOYA, B. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **J Infect Dis**, v. 201, n. 9, p. 1308-15, May 1 2010.
- ALVAREZ, J. M. et al. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 912965, 2014.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.
- ATAMNA, H.; KUMAR, R. Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S439-52, 2010.
- AURELIANO, D. P. et al. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 23, p. 1-8, Sep 2018.
- BAHIA, M. T. et al. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4362-4370, 2014.
- BALOUZ, V.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Adv Parasitol**, v. 97, p. 1-45, 2017.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan 2011.
- BARNETT, E. D.; WALKER, P. F. Role of immigrants and migrants in emerging infectious diseases. **Med Clin North Am**, v. 92, n. 6, p. 1447-58, xi-xii, Nov 2008.
- BASILE, L. et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveill**, v. 16, n. 37, Sep 15 2011.
- BEIG, M. et al. Trypanothione reductase: a target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003773-e0003773, 2015.
- BERENBAUM, M. C. A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 122-130, 1978.

- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, Apr 2016.
- BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 278-89, Apr 2004.
- BODA, C. et al. Trypanocidal activity of methylene blue. Evidence for in vitro efficacy and in vivo failure. **Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 16-9, 2006.
- BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v. 21, p. 11, 2014.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Current molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 510-518, 2008.
- BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annu Rev Pathol**, Oct 24 2018.
- BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 6b, p. 1373-84, Jun 2010.
- BOSCH, F.; ROSICH, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. **Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171-9, 2008.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962.
- BRITTO, C. et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**, v. 110 (Pt 3), p. 241-7, Apr 1995.
- BUCHHOLZ, K. et al. Cytotoxic interactions of methylene blue with trypanosomatid-specific disulfide reductases and their dithiol products. **Mol Biochem Parasitol**, v. 160, n. 1, p. 65-9, Jul 2008.
- BUCHWALOW, I.; BOECKER, W.; TIEMANN, M. The contribution of Paul Ehrlich to histochemistry: a tribute on the occasion of the centenary of his death. **Virchows Arch**, v. 466, n. 1, p. 111-6, Jan 2015.
- BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2592-7, Nov 1996.
- CABRAL-PICCIN, M. P. et al. Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Death Dis**, v. 7, p. e2232, May 19 2016.
- CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **J Immunol**, v. 159, n. 12, p. 6131-9, Dec 15 1997.

- CAMPOS, J. D. et al. Use of Noninvasive Parameters to Evaluate Swiss Webster Mice During *Trypanosoma cruzi* Experimental Acute Infection. **J Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 280-5, Apr 2016.
- CANCINO-FAURE, B. et al. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. **Transfusion**, v. 55, n. 6, p. 1249-55, Jun 2015.
- CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and disease**, v. 73, n. 9, p. ftv082-ftv082, 2015. ISSN 2049-632X.
- CARDILLO, F et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, Jan 1996.
- CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: an update. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363-368, 2015.
- CASTELLI, F.; SULIS, G. Migration and infectious diseases. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 5, p. 283-289, May 2017.
- CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471-9, Aug 2006.
- CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomed Environ Sci**, v. 1, n. 1, p. 19-33, Jun 1988.
- CAWEIN, M. et al. HEREDITARY DIAPHORASE DEFICIENCY AND METHEMOGLOBINEMIA. **Arch Intern Med**, v. 113, p. 578-85, Apr 1964.
- CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug Design Development and Therapy**, v. 9, p. 4807-4823, 2015.
- CHAUHAN, S. C.; PADMANABHAN, P. K.; MADHUBALA, R. Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 11, p. 957-65, Nov 2008.
- CHOU, T.-C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984/01/01/ 1984.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-5, Jun 24 2010.
- CONNERS, E. E. et al. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta tropica**, v. 156, p. 68-78, 2016.
- COULIBALY, B. et al. Efficacy and safety of triple combination therapy with artesunate-amodiaquine-methylene blue for falciparum malaria in children: a randomized controlled trial in Burkina Faso. **J Infect Dis**, v. 211, n. 5, p. 689-97, Mar 1 2015.

- COULIBALY, B. et al. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5318, 2009.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.
- COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 24 2010.
- DA COSTA, T. A. et al. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 962047, 2014.
- DA SILVEIRA, A. B. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007.
- DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3, p. 170-188, 2009.
- DE BONA, E. et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Front Immunol**, v. 9, p. 1842, 2018.
- DE FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 3, p. e24-e24, 2006.
- DE FUENTES-VICENTE, J. A. et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. **Acta Trop**, v. 183, p. 23-31, Jul 2018.
- DE MEIS, J. et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 574020-574020, 2012.
- DEROSE, K. P.; ESCARCE, J. J.; LURIE, N. Immigrants and health care: sources of vulnerability. **Health Aff (Millwood)**, v. 26, n. 5, p. 1258-68, Sep-Oct 2007.
- DEVILLE, W. et al. Health care for immigrants in Europe: is there still consensus among country experts about principles of good practice? A Delphi study. **BMC Public Health**, v. 11, p. 699, Sep 13 2011.
- DIAS, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitol Today**, v. 3, n. 11, p. 336-41, Nov 1987.
- DÍAZ DE TORANZO, E. G. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-1, Oct 1988.
- FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734-747, May 2012.

FLOHE, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 1, p. 294-301, Jan-Feb 2012.

FRANCISCO, A. F. et al. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. **Sci Rep**, v. 6, p. 35351, Oct 17 2016.

FRESNO, M.; GIRONES, N. Regulatory Lymphoid and Myeloid Cells Determine the Cardiac Immunopathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Front Microbiol**, v. 9, p. 351, 2018.

GABRIELLI, D. et al. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochem Photobiol**, v. 79, n. 3, p. 227-32, Mar 2004.

GARAVITO, G. et al. The in vivo antimalarial activity of methylene blue combined with pyrimethamine, chloroquine and quinine. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 820-3, Sep 2012.

GIRONES, N. et al. The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. **Vox Sang**, v. 91, n. 4, p. 285-91, Nov 2006.

GIRONES, N. et al. Global metabolomic profiling of acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3337, Nov 2014.

GONCALVES, V. M. et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **J Biol Chem**, v. 286, n. 15, p. 13088-95, Apr 15 2011.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115-123, Jan 2012.

HOWLAND, R. H. Methylene Blue: The Long and Winding Road From Stain to Brain: Part 2. **J Psychosoc Nurs Ment Health Serv**, v. 54, n. 10, p. 21-26, Oct 1 2016.

JABARI, S. et al. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 235-244, 2014.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **J Clin Immunol**, v. 30, n. 5, p. 628-31, Sep 2010.

KRAUTH-SIEGEL, L. R.; COMINI, M. A.; SCHLECKER, T. The trypanothione system. **Subcell Biochem**, v. 44, p. 231-51, 2007.

KUPFER, A. et al. Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. **Lancet**, v. 343, n. 8900, p. 763-4, Mar 26 1994.

LAGO, A. D. N. et al. Resolution of herpes simplex in the nose wing region using photodynamic therapy and photobiomodulation. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 23, p. 237-239, Sep 2018.

LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 299-304, Apr 2003.

LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H.; LORENZO, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 34-47, 2013.

LEE, D. K.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. The thymus and the immune system: layered levels of control. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 10 Suppl 4, p. S273-6, Oct 2010.

LEITE-DE-MORAES, M. C. et al. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 77, n. 1, p. 95-8, Sep 1992.

LEPLETIER, A. et al. *Trypanosoma cruzi* disrupts thymic homeostasis by altering intrathymic and systemic stress-related endocrine circuitries. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2470-e2470, 2013.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 11, p. 899-911, 2016.

LU, G. et al. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 59, 2018/04/25 2018. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1045-3> >.

MANARIN, R. et al. Efficacy of novel benzimidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Int**, v. 62, n. 1, p. 79-81, Feb 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 6 2007.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. **Rev Esp Cardiol**, v. 62, n. 11, p. 1211-6, Nov 2009.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 319-24, Jul 2009.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MAUEL, J. Intracellular parasite killing induced by electron carriers. I. Effect of electron carriers on intracellular *Leishmania* spp. in macrophages from different genetic backgrounds. **Mol Biochem Parasitol**, v. 13, n. 1, p. 83-96, Sep 1984.

MAYA, J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 999-1006, Mar 15 2003.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, // 2017.

MONCAYO, A. Carlos Chagas: biographical sketch. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 1-4, Jul-Aug 2010.

MORAK-MLODAWSKA, B.; PLUTA, K.; JELEN, M. Estimation of the lipophilicity of new anticancer and immunosuppressive 1,8-diazaphenothiazine derivatives. **J Chromatogr Sci**, v. 53, n. 4, p. 462-6, Apr 2015.

MOREIRA, O. C. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. **Acta Trop**, v. 125, n. 1, p. 23-31, Jan 2013.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 3, p. 465-81, Feb 2015.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 373, n. 14, p. 1295-306, Oct 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOSNAIM, A. D. et al. Phenothiazine molecule provides the basic chemical structure for various classes of pharmacotherapeutic agents. **Am J Ther**, v. 13, n. 3, p. 261-73, May-Jun 2006.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012.

NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 12, p. 823-36, Nov 11 2011.

NEMEZIO, M. A. et al. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 20, p. 234-237, Dec 2017.

NOBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 653-5, Apr 2009.

NOGUEIRA-PAIVA, N. C. et al. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 51-60, 2014.

NOYA, B. A. D. et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377-386, 2015.

ONOFRIO, L. I. et al. *Trypanosoma cruzi* infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003464, Feb 2015.

OZ, M.; LORKE, D. E.; PETROIANU, G. A. Methylene blue and Alzheimer's disease. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 8, p. 927-32, Oct 15 2009.

PAROLI, A. F. et al. NLRP3 Inflammasome and Caspase-1/11 Pathway Orchestrate Different Outcomes in the Host Protection Against *Trypanosoma cruzi* Acute Infection. **Front Immunol**, v. 9, p. 913, 2018.

PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E.; PEREZ-SILANES, S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 28, p. 3154-3170, 2016.

PENAS, F. N. et al. Hepatic injury associated with *Trypanosoma cruzi* infection is attenuated by treatment with 15-deoxy-Delta(12,14) prostaglandin J2. **Exp Parasitol**, v. 170, p. 100-108, Nov 2016.

PEREZ, A. R. et al. Role of Hormonal Circuitry Upon T Cell Development in Chagas Disease: Possible Implications on T Cell Dysfunctions. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 334, 2018.

PEREZ, A. R. et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 7, p. 890-900, Oct 2007.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jan 6 2018.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Trop**, v. 103, n. 3, p. 195-200, Sep 2007.

PLANER, J. D. et al. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, Jul 2014.

PLUTA, K.; MORAK-MLODAWSKA, B.; JELEN, M. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 8, p. 3179-89, Aug 2011.

PROVIDELLO, M. V. et al. ROLE OF ASCORBIC ACID AS SUPPORTING IN THE THERAPEUTIC OF CHAGAS DISEASE: BENEFITS IN THE ASSOCIATION WITH LOW DOSE OF BENZNIDAZOLE. **Antimicrob Agents Chemother**, Jul 9 2018.

RASSI, A., JR.; MARIN, J. A. N.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224-235, 2017.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012. ISSN 1557-9824.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 152-8, Jul 2009.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993.

RODEWALD, H. R. Thymus organogenesis. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 355-88, 2008.

RODRIGUEZ, H. O. et al. *Trypanosoma cruzi* strains cause different myocarditis patterns in infected mice. **Acta Trop**, v. 139, p. 57-66, Nov 2014. ISSN 0001-706x.

ROJAS, J. C.; BRUCHEY, A. K.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. **Prog Neurobiol**, v. 96, n. 1, p. 32-45, Jan 2012.

ROSSI, M. A.; BESTETTI, R. B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. **Cardiology**, v. 86, n. 1, p. 1-7, 1995.

SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SANCHEZ-VALDEZ, F. J. et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **Elife**, v. 7, Mar 26 2018.

SANTOS, V. et al. Acute Chagas disease in the state of Para, Amazon Region: is it increasing? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. e170298, 2018.

SBEGHEN, M. R. et al. Topical and Intradermal Efficacy of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Light-Emitting Diode in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **J Lasers Med Sci**, v. 6, n. 3, p. 106-11, 2015.

SCARIM, C. B. et al. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **Eur J Med Chem**, v. 155, p. 824-838, Jul 15 2018.

SCHERRMANN, J. M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. **Vascul Pharmacol**, v. 38, n. 6, p. 349-54, Jun 2002.

SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e931, Jan 11 2011.

SCHIRMER, R. H. et al. "Lest we forget you--methylene blue...". **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 12, p. 2325.e7-16, Dec 2011.

SCHIRMER, R. H. et al. Methylene blue as an antimalarial agent. **Redox Rep**, v. 8, n. 5, p. 272-5, 2003.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 30 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012.

SILVA, D. R. et al. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 211-6, Mar 2012.

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012.

SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Trop Med Int Health**, v. 21, n. 5, p. 590-6, May 2016.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592-630, Jul 2011.

TROST, M. et al. Immigration: analysis, trends and outlook on the global research activity. **J Glob Health**, v. 8, n. 1, p. 010414, Jun 2018.

TRZASKA, W. J. et al. Species-specific antifungal activity of blue light. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 4605, Jul 4 2017.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 287-95, 2002.

_____. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010 Jul-Aug 2010.

VAN DE WATERBEEMD, H.; SMITH, D. A.; JONES, B. C. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. **J Comput Aided Mol Des**, v. 15, n. 3, p. 273-86, Mar 2001.

VARGA, B. et al. Possible Biological and Clinical Applications of Phenothiazines. **Anticancer Res**, v. 37, n. 11, p. 5983-5993, Nov 2017.

VENNERSTROM, J. L. et al. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 12, p. 2671-7, Dec 1995.

VIGNIER, N.; BOUCHAUD, O. Travel, Migration and Emerging Infectious Diseases. **Ejifcc**, v. 29, n. 3, p. 175-179, Nov 2018.

VOLPE, D. A. Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development. **Expert Opin Drug Discov**, v. 11, n. 1, p. 91-103, 2016.

VUTSKITS, L. et al. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system. **Anesthesiology**, v. 108, n. 4, p. 684-92, Apr 2008.

WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 3, p. 240-248, 2011/09/01/ 2011.

WAINWRIGHT, M.; MEEGAN, K.; LOUGHRAN, C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. **Dyes and Pigments**, v. 91, n. 1, p. 1-5, 2011/10/01/ 2011.

WALECKX, E.; GOURBIÈRE, S.; DUMONTEIL, E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 324-338, 2015.

WEI, B. et al. Development of a PCR Assay to Detect Low Level *Trypanosoma cruzi* in Blood Specimens Collected with PAXgene Blood DNA Tubes for Clinical Trials Treating Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 12, p. e0005146, Dec 2016.

WINCKER, P. et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. **Parasitology**, v. 114 (Pt 4), p. 367-73, Apr 1997.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103-141, 2013/04/01/ 2013.

ZINGALES, B. et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 0, p. 0, Aug 22 2014.

ZOUNGRANA, A. et al. Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1630, Feb 20 2008.

ANEXOS

Anexo 1. Documento de aprovação da CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Determinação *in vitro* e *in vivo* do efeito tripanocida de corantes fenotiazínicos na infecção por *Trypanosoma cruzi*", registrada sob nº 18.1.446.60.1, sob a responsabilidade de Gisele Bulhões Portapilla e Sérgio de Albuquerque, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 27/09/18 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	03/10/18 a 03/01/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Isogênico Balb/C
Nº de animais	90
Peso/Idade	20g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central PUSP RP

Ribeirão Preto, 01 de outubro de 2018.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP