

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA ASSOCIADA À
RIBOFLAVINA EM EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* -
ESTUDO *In vitro*.**

BRAYAN SAYED LÓPEZ CASTAÑEDA

Botucatu, SP

Junho 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA ASSOCIADA À
RIBOFLAVINA EM EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* -
ESTUDO *In vitro*.**

BRAYAN SAYED LÓPEZ CASTAÑEDA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de mestre.

**Orientador Prof. Dr. Raimundo Souza
Lopes.**

Botucatu, SP

Junho 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

López-Castañeda, Brayan Sayed.

Efeito da radiação ultravioleta associada à riboflavina em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* : estudo In vitro / Brayan Sayed López-Castañeda. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raimundo Souza Lopes

Capes: 50503030

1. Chagas, Doença de. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Radiação ultravioleta. 4. Riboflavina. 5. Protozoário. 6. Fototerapia.

Palavras-chave: Doença de chagas; Epimastigotas; Riboflavina; Terapia fotodinâmica; *Trypanosoma cruzi*.

Nome do autor: Brayan Sayed López Castañeda

Título: Efeito da radiação ultravioleta associada à Riboflavina em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* - estudo *In vitro*.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

Dr^a. Leizinara Gonçalves Lopes

Membro

Autônomo

Data de defesa: 30 de junho de 2016.

Dedicatória

A minha mãe, guia celestial que me conduz pelos melhores caminhos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **minha família** por me apoiar na distancia neste momento importante.

A minha segunda mãe **Elvira Castañeda** exemplo de trabalho, humildade e persistência.

Aos meus tios **Carlos, Juan Carlos e Pablo** meus exemplos de vida.

A **Nathalia Celeita Rodríguez** por converter-se em minha melhor companheira de aventura e ser a promotora da minha infinita felicidade.

A **família Celeita Rodríguez** pelo carinho e apoio incondicional

Ao meu orientador **Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes** pela confiança depositada e por ter-me dado à oportunidade de ser parte do seu grupo de pesquisa.

A **Daniela Dabus e Leizinara Lopes** pela paciência, carinho e ajuda nos momentos difíceis.

A família do **Laboratório Clínico Veterinário UNESP-Botucatu**, pelo carinho recebido e disposição incondicional.

A **Profa. Dra. Regina Takahira** pelos ensinamentos e sua carinhosa disposição.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Hataka** pela sua disposição incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia **UNESP – Campus Botucatu**, por ter-me brindado a oportunidade de fazer a pós-graduação e vir a conhecer um lindo país chamado Brasil.

Ao **Prof. Dr. Helio Langoni** pelo fornecimento da cepa e por ter posto a disposição deste estudo, seu laboratório e equipe de trabalho.

As residentes do **Laboratório de Zoonose** da UNESP-Botucatu pela ajuda durante o desenvolvimento da parte experimental.

A **Benedito** pelos ensinamentos e ajuda durante o desenvolvimento da parte experimental desta pesquisa.

A **Diego Rodríguez** e **Oscar Sierra** parceiros de aventuras e cafés.

“Esta é minha doutrina. Aquele que quer aprender a voar um dia, deve desde logo aprender a manter-se de pé, a andar, a correr, a saltar, a subir e a dançar.

Não se aprende a voar logo à primeira tentativa!”

Nietzsche

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mediana com valores máximos e mínimos das absorvâncias, obtidas como resultado do teste MTT nos diferentes grupos experimentais.	36
Tabela 2: Cinética de replicação das epimastigotas de <i>T. cruzi</i> experimento I, em concentração de parasitas/mL, na 0 hora (0h); 48 horas (48h); 72 horas (72h); 96 horas (96h) e 120 horas (120h) após tratamento dos grupos: Controle (GC _I); Vazio (GVZ _I); Veículo (GV _I); Riboflavina (GRB _I); Luz (GL _I); Luz + Veículo (GL + V _I) e Grupo Tratamento (GTo _I).....	41
Tabela 3: Resultado de absorvância do teste MTT _{II} , apresentados com os valores das medianas e seus respectivos valores máximos e mínimos, nos diferentes grupos experimentais submetidos a 70 minutos de irradiação.	44
Tabela 4: Cinética de replicação das epimastigotas de <i>T. cruzi</i> experimento II, em concentração de parasitas/mL, na 0 hora (0h); 48 horas (48h); 72 horas (72h) e 96 horas (96h), após tratamento dos grupos: Controle (GC _{II}); luz (GL _{II}); luz + veículo (GL+V _{II}) e Grupo tratamento (GTo _{II}).....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Teste de viabilidade celular MTT, registro dos valores de absorbância dos grupos experimentais: grupo controle (GC); grupo vazio (GVZ); grupo veículo (GV); grupo riboflavina (GRB); grupo luz (GL); grupo luz + veículo (GL + V); e grupo tratamento (GTo), após tratamento do EXPERIMENTO I. Os dados representam o efeito citotóxico imediato da associação de irradiação UV e riboflavina. Os valores são apresentados como mediana com seus respectivos valores mínimos e máximos. de acordo com o teste Mann Whitney (*P<0,05; **P<0,005 e ***P<0,0005). 38
- Figura 2.** Valor percentual da viabilidade dos grupos experimentais 24 horas após tratamento EXPERIMENTO I. GC: grupo controle; GVZ: grupo vazio; GV: grupo veículo; GRB: grupo riboflavina; GL: grupo luz; GL + V: grupo luz + veículo; GTo: grupo tratamento. Os valores são apresentados como medianas com valores máximos e mínimos. 40
- Figura 3.** Cinética de replicação dos grupos experimentais após tratamento durante o período de acompanhamento EXPERIMENTO I. GC: grupo controle; GVZ: grupo vazio; GV: grupo veículo; GRB: grupo riboflavina; GL: grupo luz; GL+V: grupo luz UV+veículo; GTo: grupo tratamento 48h: 48 horas; 72h: 72 horas; 96h: 96 horas; 120h: 120 horas. 43
- Teste de viabilidade celular MTTII, registro dos valores de absorbância dos grupos experimentais: grupo controle (GCII); grupo luz (GLII); grupo luz UV+veículo (GL+VII); e grupo tratamento (GToll), após tratamento EXPERIMENTO II. Os dados representam o efeito citotóxico imediato da associação de irradiação UV e riboflavina. Os valores são apresentados como mediana com seus respectivos valores mínimo e máximo. 46
- Figura 5.** Valor percentual da viabilidade dos grupos experimentais 24 horas após tratamento EXPERIMENTO II. GC: grupo controle; GL: grupo luz; GL+V: grupo luz UV+veículo; GTo: grupo tratamento. Os valores são apresentados como medianas com valores mínimos e máximos. 47
- Figura 6.** Cinética de replicação após tratamento dos grupos: Controle (GCII); Luz (GLII); Luz + Veículo (GL + VII) e Grupo Tratamento (GToII), em concentração de parasitas/mL, durante o período de acompanhamento do EXPERIMENTO II. 48 horas (48h); 72 horas (72h) e 96 horas (96h). 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição dos grupos do EXPERIMENTO I com seus respectivos tratamentos.	31
Quadro 2. Distribuição dos grupos do EXPERIMENTO II com seus respectivos tratamentos.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

DC	Doença de Chagas
GC	Grupo Controle
GL	Grupo Luz
GL+V	Grupo Luz + Veículo
GRB	Grupo Riboflavina
GTo	Grupo Tratamento Luz + Riboflavina
GVZ	Grupo Vazio
GV	Grupo Veículo
Luz UV	Luz Ultravioleta
LIT	Liver Infusion Tryptose
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
RB	Riboflavina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. HISTÓRIA	18
2.2. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	19
2.3. AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	21
2.4. TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS	22
2.5. PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS	23
2.6. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	24
2.7. TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)	25
2.8. ASSOCIAÇÃO DE LUZ ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA	26
3. OBJETIVOS E HIPÓTESE	27
3.1. OBJETIVO GERAL.....	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.3. HIPÓTESE	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO	28
4.2. FOTOSSENSIBILIZADOR	28
4.3. FONTE E DOSE DE LUZ ULTRAVIOLETA	29
4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.5. ENSAIOS DE FOTOTOXICIDADE	30
4.5.1. PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO - EXPERIMENTO I	30
4.5.2. PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO - EXPERIMENTO II	31
4.6. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR.....	32
4.6.1. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2 - yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	32

4.7.	TESTE DE EXCLUSÃO CELULAR DO AZUL DE TRIPAN	33
4.8.	CINÉTICA DE REPLICAÇÃO.....	34
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.1.	EXPERIMENTO I.....	36
6.1.1.	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – MTT _I	36
6.1.2.	TESTE DE EXCLUSÃO CELULAR DO AZUL DE TRIPAN I.....	39
6.1.3.	CINÉTICA DE REPLICAÇÃO EM MEIO LIT _I	41
6.2.	EXPERIMENTO II	44
6.2.1.	TESTE DE EXCLUSÃO CELULAR DO AZUL DE TRIPAN _{II}	46
6.2.2.	CINÉTICA DE REPLICAÇÃO EM MEIO LIT _{II}	48
7.	CONCLUSÕES	50
8.	REFERÊNCIAS.....	51
9.	TRABALHO CIENTÍFICO.....	55
	APÊNDICES	76

LÓPEZ-CASTAÑEDA, B. **Efeito da radiação ultravioleta associada à Riboflavina em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* - estudo *In vitro*.** Botucatu, 2016. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julho de mesquita filho”.

RESUMO

A Doença de Chagas é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário flagelado que se transmite por múltiplas vias e que se estabelece no sangue e diversos órgãos dos indivíduos infectados. A doença é endêmica no Brasil e representa uma das causas frequentes de morte, pois as alternativas terapêuticas além de serem limitadas, apresentam resultados razoavelmente efetivos. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* os efeitos da Terapia Fotodinâmica utilizando dois protocolos de radiação de luz ultravioleta associados à riboflavina, sobre epimastigotas de *T. cruzi*. Resultados dos testes de viabilidade celular MTT e Azul de Tripán, e do acompanhamento da cinética de crescimento, não registraram efeitos citotóxicos imediatos ou tardios sobre os protozoários. Contrário ao esperado, os resultados indicam um aumento na multiplicação das epimastigotas tratadas. Com este estudo permitiu-se concluir que, a radiação de luz ultravioleta associada à riboflavina, não é eficaz no controle e/ou eliminação de epimastigotas do *T. cruzi*, e que novos estudos deveriam ser desenvolvidos para tentar identificar as variáveis que influenciam a multiplicação do protozoário.

Palavras chave: Doença de Chagas, epimastigotas, riboflavina, terapia fotodinâmica, *Trypanosoma cruzi*.

LÓPEZ-CASTAÑEDA, B. **Effect of ultraviolet radiation associated with riboflavin in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* – study *In vitro***. Botucatu, 2016. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julho de mesquita filho”.

ABSTRACT

Chagas disease is a zoonotic disease caused by *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) a flagellate protozoan that is transmitted by multiple pathways and that is established in blood and various organs of infected individuals. The disease is endemic in Brazil and is one of the common causes of death, for therapeutic alternatives as well as being limited, present fairly effective results. This study aimed to evaluate in vitro the effects of photodynamic therapy using two ultraviolet radiation protocols associated with riboflavin on *Trypanosoma cruzi* epimastigote. Results of cell viability tests MTT and Trypan Blue, and monitoring the growth kinetics, reported no immediate cytotoxic effects or late on protozoa. Interestingly, the results suggest an increase in proliferation of treated epimastigote. This study allowed to conclude that the radiation of ultraviolet light associated with riboflavin, is not effective in controlling and / or eliminating Epimastigote T. cruzi, and that further studies were to be developed to help identify the variables that influence the multiplication the protozoan.

Keywords: Chagas disease, epimastigotas, riboflavin, photodynamic therapy, *Trypanosoma cruzi*.

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo revela resultados experimentais dos efeitos da radiação ultravioleta associada à riboflavina no controle, redução ou na completa eliminação de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esperando com isso poder contribuir de alguma forma no tratamento desta enfermidade e fornecer informações importantes para a implantação desta técnica na inativação de diferentes patógenos encontrados no sangue.

Atualmente a Doença de Chagas (DC) é uma infecção sem tratamento e epidemiologicamente difícil de controlar, pois ao longo do tempo, o parasita tem acumulado especiais características adaptativas que dificultam sua eliminação.

Em humanos, a DC desenvolve um quadro clínico de sintomatologia inespecífica com febre e mal estar geral (fase aguda) que acaba não sendo considerado como motivo de consulta. Tal negligência permite que a infecção avance durante vários anos, até o indivíduo apresentar sinais e sintomas graves, associados às falhas estruturais e funcionais dos sistemas cardíaco e/ou digestivos como consequência do estabelecimento da fase crônica da doença (CHAGAS, 1909; MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2015).

Como única alternativa eficaz de tratamento para pacientes infectados se tem o uso de fármacos tripanocidas, porém, o tratamento tem se mostrado razoavelmente efetivo apenas na fase aguda da doença e totalmente ineficaz na fase crônica, porém, a disponibilidade e acessibilidade dos fármacos em alguns países endêmicos é limitada, o que diminui a chance de cura para algumas populações (PONTES et al., 2010).

Fundamentados nas evidências tanto da inexistência de tratamento eficaz, como na resistência própria do parasita, desafiamos experimentalmente um protocolo de terapia fotodinâmica (TFD), usando a luz ultravioleta associada à riboflavina como substância fotossensível sobre formas epimastigotas do *T. cruzi*. Mesmo protocolo que em outras oportunidades demonstrou eficácia na redução da carga parasitária de *Anaplasma marginale* e *Leishmania infantum*

chagasi e evitou a manifestação clínica das doenças após inoculação experimental dos agentes etiológicos tratados em animais suscetíveis (LOPES, 2011; SACCO, 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRIA

Duas coisas sobressaem no momento que se decide estudar a Doença de Chagas, a primeira delas, sua importante situação epidemiológica e a segunda pelo fato de ser desenvolvida apenas por um único protagonista em um curto período de tempo.

Historicamente temos como referência o dia 14 de abril de 1909, data na qual foi anunciada a descoberta da “nova tripanosomiose humana” - mais tarde denominada DC. Porém, cabe ressaltar que em Junho de 1907, quando a petição do Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz - então diretor do Instituto Oswaldo Cruz, é mobilizada uma comissão médica composta por Carlos Chagas e Belisário Penna, que iria até a região norte de Minas Gerais para a execução de campanhas contra a malária, uma doença incapacitante e mortal que estava atingindo os trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil (CHAGAS 1909; THIELEN e SANTOS, 2002).

Tempo depois, Carlos Chagas consegue identificar pela primeira vez numerosas formas flageladas no conteúdo intestinal de um inseto hematófago, triatomídeo, de hábitos noturnos, chamado popularmente “barbeiro”- que atacava especificamente o rosto das pessoas. Este fato ocorre em dezembro de 1908 e considera-se um achado de extrema importância, dado que mais tarde, o inseto iria ser descrito como o responsável pela transmissão dos parasitas, ou seja, o vetor da doença (CHAGAS, 1909).

Até esse momento o parasita tinha sido identificado apenas em alguns animais da região com aparentes sinais e sintomas de enfermidade, uns infectados naturalmente e outros de forma experimental. No entanto, o dia 14 de abril de 1909, identifica-se pela primeira vez o parasita no sangue da Berenice, uma criança febril que estava aos cuidados do Dr. Chagas. Esta

seria então a última peça que o Dr. Carlos Chagas precisaria para fechar um círculo de associações e descrever de forma detalhada o microrganismo causador da enfermidade, os reservatórios domésticos e silvestres, o ciclo dentro do inseto vetor e às manifestações clínicas no homem, da doença anunciada à comunidade científica como a “nova tripanossomíase humana”, doença que aparentemente, seria a causa da sua morte (CHAGAS, 1909; ZINGALES, 2011; GODÍNEZ, 2012)

2.2. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Apesar de ter-se descrito ao *T. cruzi* como agente etiológico da Doença de Chagas há pouco mais de um século, acredita-se que a infecção pode ser tão antiga como a existência da espécie humana sobre a face da terra (CHAGAS, 1909; AUFDERHEIDE et al., 2004; ARAÚJO et al., 2009). Esta teoria foi confirmada por um grupo de pesquisadores, após identificar ácido desoxirribonucleico (DNA) do protozoário em múmias - algumas delas com aproximadamente 9.000 anos - localizadas em sítios arqueológicos da zona costeira da América do Sul, especificamente entre o norte do Chile e o sul de Peru (AUFDERHEIDE et al. 2004).

Originalmente o parasita estava restrito aos ecossistemas silvestres, e circulava apenas entre os vetores e algumas espécies de animais (hospedeiros) como uma infecção enzoótica (ARAÚJO et al., 2009). Logo depois da inclusão acidental do homem no ciclo da doença, a infecção passou a ser classificada como antropozoonose estabelecida, mantendo-se em transferência ativa por meio de três ciclos: selvagem, peridoméstico e doméstico (AULT, 2007; BRICEÑO-LEÓN e GALVAN, 2007; COURA et al., 2007; COURA e DIAS, 2009).

Geograficamente a infecção encontra-se distribuída entre o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, onde as características ecológicas, como: clima, diversidade de reservatórios naturais e milhares de espécies de

insetos vetores, garantem o desenvolvimento natural da doença e mantém ativo o parasita nos ciclos silvestre, peridoméstico e doméstico, definidos assim pelo tipo do entorno ecológico onde interatuam parasitas, vetores e hospedeiros (SPICKLER, 2009; RASSI e MARIN-NETO, 2010; KASHIWABARA et al., 2013).

Atualmente a DC é considerada um sério problema de saúde pública, pois é endêmica em 22 países da América Latina, registrando aproximadamente de oito milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* no mundo e se estima que ocorrem ao redor de 10.000 óbitos por ano associados às lesões causadas pelo parasita (COURA e VIÑAS, 2010; OMS, 2016). Somado a isso, a contínua migração de populações infectadas tem auxiliado na expansão do parasita a países não endêmicos, em que a transfusão sanguínea e o transplante de órgãos são o principal mecanismo de transmissão (SCHMUNIS, 2007).

No Brasil, a DC é endêmica na região da Amazônia legal, uma área que engloba os estados de Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins e parte dos estados do Mato Grosso e Maranhão. A transmissão vetorial se estabelece como a principal via de infecção (KASHIWABARA et al., 2013). Porém, apesar da ampla distribuição do parasita e das características do ecossistema que o Brasil oferece, a Organização Panamericana da Saúde em 2006, certifica que o país teria conseguido reduzir de forma considerável as taxas de transmissão vetorial da DC depois das intensas campanhas de controle do vetor como as que tornaram possível “eliminar” o *Triatoma infestans*, inseto responsável pela transmissão do parasita (BARBOSA et al., 2015).

Entre 2005 e 2013, 112 surtos foram reportados entre 2005 e 2013 na Região Amazônica e fizeram com que as atividades de controle contra a DC fossem retomadas e intensificadas, pois os acontecimentos seriam produto do surgimento de uma nova forma de contaminação. Durante o acompanhamento dos indivíduos infectados foi possível revelar a via oral como fonte importante de infecção, dado que todos os casos estiveram diretamente associados ao consumo de alimentos contaminados com o *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE,

2015). Porém, o risco de transmissão vetorial da doença não estava totalmente controlado, pois novas espécies de triatomíneos com alto potencial de transmissão vetorial estariam também surgindo e colonizando os ecossistemas (FERREIRA e SILVA, 2006).

2.3. AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado polimórfico e estruturalmente parecido com as células eucariotas, porém possui organelas próprias como o cinetoplasto, que o diferenciam de outras espécies de protozoários e auxiliam na identificação do parasita (BRENER, 1973). O cinetoplasto é um acúmulo de DNA extranuclear que corresponde entre 15% e 30% do total do DNA do parasita, localizado dentro da mitocôndria e cumpre funções importantes de síntese protéica e autorreplicação (CHAGAS, 1909; ARAÚJO et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2011).

Um entendimento da biologia do *T. cruzi* tem sido um desafio, pois este manifesta uma importante heterogeneidade biológica, caracterizada por diferenças morfológicas, conteúdo de DNA, virulência, patogenicidade e uma suscetibilidade a drogas, entre isolados da mesma espécie. Dita particularidade, tem dificultado não só na classificação “universal” que facilite o entendimento do *T. cruzi*, como também tem dificultado o desenvolvimento de uma estratégia farmacológica de tratamento definitivo para a Doença de Chagas (DEVERA et al., 2003; ZINGALES, 2011)

O pleomorfismo e as características adaptativas do *T. cruzi* são facilmente evidenciadas durante o ciclo biológico, onde transformações morfológicas e metabólicas são necessárias para a transferência e estabelecimento do parasita entre o vetor e o hospedeiro. Inicialmente, os parasitas são ingeridos pelo inseto nas formas de tripomastigotas sanguíneas e se alojam na porção media do trato digestório, onde posteriormente são transformadas em epimastigotas. As formas flageladas de tamanho variável e de alta taxa de

proliferação que avançam até a porção final do trato onde sofrem uma nova transformação, agora como tripomastigotas metacíclicas, altamente infectantes que serão expelidas nas fezes do vetor durante novos repastos (CHAGAS, 1909; KASHIWABARA et al., 2013).

O ciclo continua logo depois que os parasitas penetram o organismo do hospedeiro vertebrado, por meio do contato direto com mucosas ou por pequenas feridas na pele, principalmente por aquela provocada pela picada do inseto (CHAGAS, 1909). Uma vez rompida à barreira física da pele, as tripomastigotas metacíclicas invadem o citoplasma de células próximas, perdem o flagelo e evoluem para amastigotas, uma forma arredondada que se replica rapidamente por fissão binária, a cada 12 horas aproximadamente e que posteriormente irão se transformar em tripomastigotas sanguíneas. Finalizada a transição, as tripomastigotas lisam as membranas celulares e acabam sendo liberadas no espaço intersticial, e invadem novas células ou migram até pequenos capilares para serem levados por meio da corrente sanguínea para infectar órgãos distantes. Nesta fase do ciclo, as tripomastigotas sanguíneas podem ser ingeridas pelos vetores, reiniciando assim o ciclo biológico do parasita (CHAGAS, 1909; BRENER, 1973; RASSI e MARIN-NETO, 2008).

2.4. TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

O principal mecanismo de infecção é a transmissão vetorial, associado especificamente ao ataque dos “barbeiros”, nome popular dado pelos regionais para descrever os insetos hematófagos da espécie triatomíneos (CHAGAS, 1909). Atualmente tem se descrito ao redor de 140 espécies de triatomíneos com capacidade de transmissão do protozoário, das quais 52 estão distribuídas no Brasil, mas apenas cinco (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata* e *T. sórdida*) são de importância epidemiológica devido seu hábito de colonizar os domicílios (COURA e DIAS, 2009; SPICKLER, 2009).

Em décadas passadas, a transfusão de hemocomponentes e o transplante de órgãos foram os responsáveis pelo crescente índice de casos de infecção com *T. cruzi*, principalmente nos países não endêmicos, onde ditas práticas se consolidaram como a fonte principal para a transmissão do parasita (SCHMUNIS, 2007). Tais suspeitas foram também levantadas nos países endêmicos da América Latina e fizeram com que todos os bancos de sangue verificassem a presença do parasita na totalidade dos seus produtos disponíveis. O resultado foi de 3% a 53% de produtos contaminados nos bancos de sangue analisados, indicando assim que a prevalência do *T. cruzi* em bancos de sangue poderia ser superior ao vírus imunodeficiência humana (HIV) e aos vírus da Hepatite B e C (CARDO et al., 2007; OMS, 2008).

Atualmente, somam-se a via de transmissão vertical, na qual o parasita migra até o feto por meio da corrente sanguínea durante todo o período de gestação (GONTIJO et al., 2009), a via sexual principalmente durante a fase aguda da doença (MARTIN et al., 2015), os acidentes de laboratório (MORENO et al., 2006; SPICKLER, 2009) e a transmissão por via oral. No caso específico da via oral considera-se que é responsável por pelo menos 70% dos casos de doença de Chagas aguda ocorridos entre os anos 2000 e 2011 especificamente pelo consumo de caldo de cana e açaí no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; BARBOSA et al., 2015).

2.5. PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS

O curso da DC começa pela fase aguda a qual ocorre de quatro a 14 dias após a infecção e se manifesta com: febre, dor de cabeça, anorexia, fraqueza, dor articular, vômito, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia geral ou localizada, durante aproximadamente seis a oito semanas. Os casos de óbito reportados na fase aguda da doença estão associados ao desenvolvimento de miocardite e meningoencefalite primária especificamente em crianças e/ou pacientes com imunossupressão (CHAGAS, 1909; SPICKLER, 2009).

Após a fase aguda, a doença entra num período de latência de duração variável, denominada fase indeterminada ou crônica indeterminada. A qual se caracteriza por resultados laboratoriais positivos para o *T. cruzi*, em pacientes que não apresentam sinais clínicos, ou alterações electrocardiográficas e radiológicas sugestivas. Nesta fase a infecção pode permanecer em período de latência por tempo indeterminado ou, evoluir nas formas crônicas sintomáticas de cinco a 20 anos após infecção inicial (RIBEIRO e ROCHA, 1998).

Na fase crônica da DC são descritas três situações clinicamente clássicas nas que a infecção evolui: 1. Forma cardíaca ou cardiopatia chagásica crônica, a qual se apresenta com arritmias e distúrbios de condução intraventricular e atrioventricular, e avança para insuficiência cardíaca com dilatação e aneurismas biventriculares; 2. Forma digestiva, forma na qual o indivíduo desenvolve dilatações do trato gastrointestinal, como: megaesôfago, megacólon, megaestomago, megaduodeno, megajejuno, megavesícula biliar e megacolédoco, e importantes distúrbios de transito intestinal. E 3. Forma mista, sendo esta a mais comum entre pacientes com imunossupressão, os quais desenvolvem conjuntamente as formas cardíaca e digestiva (KASHIWABARA, 2013).

2.6. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

A terapêutica da DC tem como objetivo eliminar o *T. cruzi* da corrente sanguínea e tecidos acometidos, no entanto, a existência insuficiente de alternativas farmacológicas representa a maior das limitações para o tratamento dos indivíduos infectados. Atualmente existem apenas dois fármacos capazes de eliminar o tripanossomo, o nifurtimox e o benzonidazol, dos quais apenas o benzonidazol está disponível comercialmente no Brasil (PONTES et al., 2010).

Por outro lado, a eficácia dos fármacos tem sido também fator limitante e de importante discussão na hora de tratar um paciente, pois os fármacos apresentam resultados razoavelmente efetivos unicamente na fase aguda da infecção (FERREIRA, 1990; KASHIWABARA, et al., 2013).

Frente a esta realidade se faz necessária e urgente a procura de alternativas de tratamento contra o *T. cruzi*, que possam aperfeiçoar a eficácia dos tratamentos existentes ou que surjam como novas opções de tratamento para a DC. É importante ressaltar que para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, algumas condições deveram ser levadas em consideração, como, ser utilizado em todos os pacientes humanos e veterinários, sendo eficiente em casos agudos e crônicos, ser de fácil acessibilidade e baixo custo, e que quando implementada, não manifeste os efeitos colaterais (URBINA, 2010; LEWIS et al., 2015).

2.7. TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste em uma modalidade terapêutica que associa substâncias fotossensíveis a diferentes fontes de luz para geração de espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres que promovem a destruição de agentes patogênicos e células alvo (ÇAMUR, et al., 2011). Recentemente no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* Botucatu, estão sendo conduzidos estudos promissores com a utilização da TFD utilizando as associações de Ftalocianina e luz visível e de riboflavina associada à irradiação ultravioleta no tratamento de agentes patogênicos (DABUS, 2015; LOPES, 2015).

Resultados anteriores demonstraram que à associação de riboflavina à radiação ultravioleta provoca imediata redução da carga parasitária de *Anaplasma marginale* no sangue de bovinos (LOPES, 2011), da mesma forma, Sacco em 2013, usando um protocolo semelhante, demonstrou que a TFD

além de reduzir a parasitária, inibiu a apresentação de sinais clínicos da Leishmaniose quando inoculados em hospedeiros com parasitas tratados.

A TFD surgiu no início do século passado com o descobrimento do efeito citotóxico da luz na presença de um corante, sobre uma cultura de protozoários (*Paramecium caudatum*), e estudos mais aprofundados possibilitaram identificar duas situações fundamentais para o uso da terapia. A primeira, a aparição do termo “reação fotodinâmica” dado que o efeito tóxico dependia da associação da luz com o agente fotossensível (corante), e não apenas à presença da luz; enquanto a segunda situação demarcava a presença de oxigênio como fator importante para o efeito da reação (PERUSSI, 2007; ISSA e MANELA-AZULAY, 2010).

O mecanismo de ação da TFD está demarcado pelo desenvolvimento de dois tipos de reação às quais de forma direta ou indireta levam a morte celular. As reações tipo I estão definidas pela formação de radicais livres, produto da transferência de elétrons entre o fotossensibilizador ativado e o oxigênio celular. Por outro lado, as reações tipo II estão associadas à transferência de energia ao oxigênio e a formação de oxigênio singleto, o qual reage com todos os componentes celulares principalmente com os fosfolipídios que compõem as membranas celulares (PERUSSI, 2007).

2.8. ASSOCIAÇÃO DE LUZ ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA

O uso da TFD com a associação de luz ultravioleta (UV) e riboflavina (RB) está fundamentado inicialmente pela irreversibilidade dos danos ao ácido nucleico, prejudicando diretamente os processos de reparo e replicação por meio da modificação direta da base guanina (GOODRICH et al., 2006). Além disso, as características de biodisponibilidade, perfil toxicológico e a sua atividade fotoquímica fazem da RB o fotossensibilizador de escolha na tentativa de redução ou eliminação os efeitos colaterais decorrentes da TFD (PERUSSI, 2007).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da radiação da luz ultravioleta associada à riboflavina na redução, completa eliminação e controle da replicação de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, no meio de cultura Liver Infusion Tryptose (LIT).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base no objetivo general acima ressaltado, utilizando luz ultravioleta associado à riboflavina esperamos:

1. Avaliar *in vitro*, a sobrevivência das epimastigotas de *T. cruzi*, após terapia fotodinâmica.
2. Verificar *in vitro* o efeito citotóxico tardio da terapia fotodinâmica sobre epimastigotas de *T. cruzi*.
3. Analisar a cinética de replicação das epimastigotas do *T. cruzi* no meio de cultura LIT, após a terapia fotodinâmica.

3.3. HIPÓTESE

Consideramos que a terapia fotodinâmica utilizando luz ultravioleta associada à riboflavina, quando utilizada *in vitro* sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, será capaz de eliminar ou de inibir a replicação do microrganismo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu (CEUA número de protocolo 26/2016). A técnica de terapia fotodinâmica foi feita no Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Aguemí Kohayagawa” e de Enfermidades Parasitárias “Profa. Dr. Mauro Rodrigues de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* Botucatu – SP. O acompanhamento da curva de replicação no meio de cultivo foi realizado no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho” - FMVZ/UNESP, Campus Botucatu - SP.

4.2. FOTOSSENSIBILIZADOR

Como agente fotossensibilizador foi usada a riboflavina (RB) na dose de 50µmol/mL (RUANE et al., 2004; REDDY et al., 2008), a qual foi preparada a partir de um reagente contendo riboflavina (RB)¹, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% com pH ajustado entre 4,0 e 5,0. Finalmente, a formulação de RB foi autoclavada e armazenada em frasco âmbar, conforme ao descrito por RUANE et al., (2004), e CARDO et al., (2007).

Em ensaios anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, foi possível validar o uso da formulação de Riboflavina (RB), ao conseguir demonstrar mediante ensaios de absorvância e fluorescência que a formulação interage

¹ RIBOFLAVINA, Vetec Química Fina Ltda

com a luz UV de forma eficiente em um comprimento de onda entre 265 e 370nm (SACCO, 2013).

4.3. FONTE E DOSE DE LUZ ULTRAVIOLETA

Como fonte de luz para a irradiação ultravioleta dos grupos experimentais, foi utilizada a estação asséptica de trabalho DNA Workstation², uma cabine de bancada equipada com lâmpadas de luz germicida de 365nm de comprimento de onda. A dose de luz utilizada no presente estudo foi de 6,2 J/mL, correspondente àquela descrita por Ruane et al., (2004) como a dose efetiva na redução de patógenos.

Ensaio desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa permitiram a validação do equipamento acima descrito, ao confirmar sua capacidade de atingir a dose ideal de 6,2 J/mL. Mediante o uso de um *Power Meter*³, foi possível determinar que numa distância de 17 centímetros da fonte de luz, com um tempo de irradiação ininterrupta de 35 minutos, o equipamento conseguia atingir a dose ideal de 6,2 J/mL (SACCO, 2013).

4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a obtenção dos dados, todos os testes propostos foram feitos em triplicata biológica com suas triplicatas técnicas, utilizando inóculo de epimastigotas de *T. cruzi*, cedidas pelo Laboratório de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” - FMVZ/UNESP, *Campus Botucatu* - SP.

² DNA Workstation, Loccus Biotecnologia®

³ Optical Associated Incorporated – OAI, Milpitas, CA.

Foi necessária a execução de dois protocolos de irradiação, pois os resultados do primeiro protocolo - no qual os grupos experimentais foram irradiados com luz UV durante 35 minutos sem interrupção (EXPERIMENTO I). Por tal razão e com o intuito de confirmar a informação obtida, foi conduzido um segundo ensaio de fototoxicidade, desta vez com protocolo de irradiação de 70 minutos ininterruptos (EXPERIMENTO II).

4.5. ENSAIOS DE FOTOTOXICIDADE

4.5.1. PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO - EXPERIMENTO I.

Como dito anteriormente, os experimentos foram conduzidos tanto em triplicatas biológicas como triplicatas técnicas. Cada uma das repetições biológicas foi obtida a partir da extração de uma alíquota da cultura matriz de epimastigotas do *T. cruzi*, a qual foi resemada em tubos de ensaio de vidro com tampa contendo meio de cultura LIT puro na proporção de 1:4 respectivamente. Os tubos foram mantidos a temperatura constante de 28°C e com acompanhamento da curva de crescimento exponencial por médio da técnica de câmara de Neubauer.

Uma vez que a curva de crescimento atingiu a fase de estabilização caracterizada pela diminuição da replicação exponencial e início da fase de manutenção, as epimastigotas do *T. cruzi* foram submetidas ao teste de exclusão celular do azul de Trypan para avaliar sua viabilidade e ajustou-se a concentração dos parasitas para 10×10^6 parasitas/mL. Imediatamente após, alíquotas os parasitas em poços de duas placas de cultura celular de 12 poços, onde foram acrescentados os complementos dos tratamentos correspondentes (Quadro 1), até completar dois mL de volume final a ser tratado.

Uma das placas após o acréscimo dos complementos (Quadro 1), foi protegida da luz ambiental com uma envoltura de papel alumínio até o fim do processo de irradiação, pois esta albergou os grupos controle (**GC₁**); vazio

(**GVZ_I**); veículo (**GV_I**) e riboflavina (**GRB_I**), grupos que não foram irradiados com a luz UV durante o procedimento. Por outro lado, a segunda placa recebeu os complementos dos grupos luz (**GL_I**); Luz + veículo (**GL+V_I**) e grupo tratamento completo (**GTo_I**) (Quadro 1), foram incubados por 15 minutos e logo depois irradiada com luz UV durante 35 minutos, posicionada sobre um homogeneizador de bolsa de sangue tipo gangorra modelo HOMBOL-061, Benfer⁴, que a manteve em constante movimento.

Quadro 1. Distribuição dos grupos do EXPERIMENTO I com seus respectivos tratamentos.

Grupo	Tratamento
Grupo controle (GC)	Parasitas que não receberam nenhum tratamento.
Grupo vazio (GVZ)	Meio de cultura LIT sem parasitas.
Grupo veículo (GV)	Parasitas que foram incubados junto com o veículo utilizado na diluição da riboflavina (solução de cloreto de sódio 0,9%).
Grupo Riboflavina (GRB)	Parasitas incubados apenas com a solução de riboflavina na concentração final de 50µmol por mililitro.
Grupo Luz (GL)	Parasitas que se submeteram apenas a irradiação unilateral de luz ultravioleta na dose de 6,2 J/mL, com comprimento de onda de 365 nm durante 35 minutos.
Grupo Luz + veículo (GL+V)	Parasitas que foram incubados junto com o veículo utilizado na diluição da riboflavina e luz UV por 35 minutos.
Grupo Luz+ Riboflavina (GTo)	Parasitas que receberam a formulação de riboflavina até atender uma concentração final de 50µmol/mL e que logo após foram irradiados com a fonte de luz UV por 35 minutos.

4.5.2. PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO - EXPERIMENTO II

Para a obtenção de dados do segundo protocolo de irradiação, repetiu-se o processo de seleção das triplicatas biológicas descrito anteriormente e distribuíram-se as epimastigotas na concentração de 10×10^6 parasitas/mL nas duas placas de cultura celular de 12 poços. Uma destas albergou os grupos controle (**GC_{II}**: grupos não irradiados) e, após o acréscimo dos complementos

⁴ Benfer Produtos para laboratórios. R. Padre Agostinho Poncet, 74. São Paulo – SP.

manteve-se protegida da luz ambiental com uma envoltura de papel alumínio durante o procedimento (Quadro 2).

Enquanto que na segunda placa foram dispostos os grupos: luz (**GL_{II}**: correspondente aos parasitas que se submeteram apenas a irradiação unilateral de luz ultravioleta na dose de 6,2 J/mL, com comprimento de onda de 365 nm durante 70 minutos no equipamento DNA Workstation). Grupo Luz + veículo (**GL+V_{II}**: parasitas que foram incubados junto com o veículo utilizado na diluição da riboflavina e que logo após, irradiaram se com a fonte de luz UV) e finalmente, o Grupo Luz + Riboflavina (**GTo_{II}**: parasitas que receberam a formulação de riboflavina até atender uma concentração final de 50µmol/mL e que logo após foram irradiados com a fonte de luz UV por 70 minutos).

Quadro 2. Distribuição dos grupos do EXPERIMENTO II com seus respectivos tratamentos.

Grupo	Tratamento
Grupo controle (GC_{II})	Parasitas que não receberam nenhum tratamento.
Grupo Luz (GL_{II})	Parasitas que se submeteram apenas a irradiação de luz ultravioleta na dose de 6,2 J/mL, com comprimento de onda de 365 nm durante 70 minutos.
Grupo Luz + veículo (GL+V_{II})	Parasitas que foram incubados junto com o veículo utilizado na diluição da riboflavina e que logo após, irradiaram se com a fonte de luz UV.
Grupo Luz+ Riboflavina (GTo_{II})	Parasitas que receberam a solução de riboflavina até atender uma concentração final de 50µmol/mL e que logo após foram irradiados com a fonte de luz UV por 70 minutos

4.6. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

4.6.1. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Para determinar o efeito citotóxico imediato, exercido pelos diferentes tratamentos nas epimastigotas de cada um dos grupos experimentais, usou-se o método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Esse teste identifica a atividade mitocondrial de

células vivas por meio da transformação do sal de tetrazólio de cor amarela em cristais de formazan de cor violácea.

Uma vez finalizados os tratamentos, alíquotas de 200µl de todas as soluções dos grupos experimentais foram extraídas e transferidas para uma placa de 96 poços. Em seguida foram acrescentados 50µmol de MTT, reconstituído em PBS (phosphate buffered saline) na concentração de 10mg/mL. A placa foi envolvida em papel alumínio e incubada a temperatura constante de 37°C durante três horas.

Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada 2.000 rpm por 10 minutos, o meio foi cuidadosamente retirado dos poços, os parasitas foram resuspendidos em 20µl de SDS (sodium dodecyl sulfate) 10% em HCL 0,01 M e incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida, 100µl de DMSO (dimetil sulfoxido) foi adicionado em todos os poços e a placa foi novamente incubada a 37°C em agitação constante até a solubilização completa dos cristais de formazan. A leitura da placa foi efetuada a 570nm em leitor de ELISA.

4.7. TESTE DE EXCLUSÃO CELULAR DO AZUL DE TRIPAN

Com o objetivo de identificar um possível efeito tardio das reações sobre as epimastigotas de *T. cruzi*, foram conduzidos testes de exclusão celular do Azul de Tripán de todos os grupos experimentais 24 horas após a execução dos tratamentos. Esse teste identifica as células mortas a partir da internalização do corante.

Depois de ter coletado as alíquotas utilizadas no teste de viabilidade celular MTT, e de ter extraído as alíquotas utilizadas na avaliação da cinética de crescimento, as placas de cultura celular - nas quais foram dispostos os diferentes grupos para a exceção dos tratamentos - foram protegidas da luz com uma envoltura de papel alumínio e incubadas durante 24 horas a temperatura constante de 28°C.

Completado o tempo de incubação, alíquotas de 50µl de cada um dos grupos experimentais foram extraídas diretamente dos poços da placa de cultura celular, e suspendidas em 50µl de azul de tripan a 2%, obtendo assim uma solução na proporção de 1:1. Os cálculos foram determinados em duplicata a partir da contagem percentual de epimastigotas, numa gota da suspensão colocada entre lâmina e lamínula e logo observadas ao microscópio óptico convencional.

4.8. CINÉTICA DE REPLICAÇÃO

Imediatamente após os tratamentos, foram extraídas de cada um dos grupos experimentais alíquotas de 1mL e resemeadas em tubos de ensaio com tampa contendo meio Liver Infusion Tryptose (LIT) puro. Os tubos foram mantidos a temperatura constante de 28°C por cinco dias, onde a cada 24 horas foram calculadas as concentrações de epimastigotas/mL, usando a técnica de câmara de Neubauer.

Para se obter a concentração dos parasitas no meio de cultura foram extraídas alíquotas de 5µl de cada um dos grupos e transferidas a tubos plásticos estéreis, contendo 1,495µl de uma solução de paraformaldeído 1% (fator de diluição: 300). Posteriormente calculado a média do número total de parasitas a partir da contagem nos quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer (região utilizada na contagem de leucócitos). Esse valor obtido multiplicou-se pelo fator de diluição, altura da câmara 10, e finalmente por 1.000, para obter assim o número de parasitas por mL de cada um dos grupos.

$$\text{Parasitas/mL} = (\text{N}^\circ \text{ parasitas}) \times (\text{fator de diluição}) \times 10 \times 1.000$$

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com a utilização de um programa estatístico (Prism 6,02; GraphPad, San Diego, CA, EUA). A normalidade da distribuição das variáveis foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Seguido dos testes Kruskal-Wallis e o teste de Mann Whitney, para comparação de variáveis não paramétricas, discutidos ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITO DA RADIAÇÃO UV ASSOCIADA À RIBOFLAVINA SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*.

6.1. EXPERIMENTO I.

6.1.1. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – MTT_i

Os resultados do teste colorimétrico MTT permitiram a identificação das epimastigotas vivas do *T. cruzi* após tratamento nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram interpretados a partir da análise da variação da absorbância entre os grupos tratados e o grupo controle. Cabe ressaltar que o valor da absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas, ou seja, quanto maior for o número de células vivas, maior será o valor da absorbância.

Os valores da absorbância do teste MTT de todos os grupos experimentais são apresentados pelo valor da mediana com seus respectivos valores mínimos e máximos, descritos na tabela 1.

Tabela 1: Mediana com valores máximos e mínimos das absorbâncias, obtidas como resultado do teste MTT nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	1,248	1,027	1,445
Vazio	0,858	0,645	1,107
Veículo	1,359	1,183	2,056
Riboflavina	1,347	1,025	1,495
Luz	1,385	1,266	1,594
Luz + Veículo	1,438	1,222	1,477
Tratamento	1,546	1,295	1,661

Quando comparados o grupo tratamento (**GTo_i**) com o grupo controle (**GC_i**), não há evidência de efeito citotóxico imediato da associação da irradiação UV e riboflavina sobre as epimastigotas do *T. cruzi* (Figura 1).

Curiosamente, os resultados da absorvância do **GTo₁** sugerem um aumento importante no número de epimastigotas vivas, quando comparados com o **GC₁** ($P < 0,0005$). Ditos achados são contrários àqueles relatados por Cardo et al., em 2007 conseguiram demonstrar que o uso da associação de luz UV e RB, como tratamento de unidades de plasma e concentrado de plaquetas de humanos, experimentalmente contaminados com *T. cruzi*, reduzia consideravelmente as taxas de replicação do parasita após tratamento. Esta redução foi evidenciada também por TONNETTI et al., (2012), quando trataram com luz UV associada a RB, bolsas de sangue total experimentalmente contaminada com *T. cruzi*.

Com os resultados deste experimento, pode-se inferir que o tipo de lesão produzida no DNA das epimastigotas pela associação da luz UV e riboflavina, sob as condições experimentais, não foram suficientes para diminuir ou eliminar o parasita. Cabe resaltar que, a ativação dos mecanismos de reparo do DNA do tipo NER (Reparo por Excisão de Nucleotídeos), o qual elimina eficientemente as lesões estruturais produzidas pela irradiação violeta, pode ser também o responsável pela não redução ou eliminação das epimastigotas (SILVA et al., 2010).

Por outra parte, e baseados nas evidências das complexas capacidades adaptativas do parasita, pode se inferir também que, a terapia fotodinâmica cria uma pressão seletiva que induz à replicação celular, pois os tripanossomatídeos possuem duas cópias de um gene promotor de fotoliase, uma proteína utilizada nos processos de reparo de DNA a luz UV e que possa ser responsável pela perpetuação dos tripanossomatídeos ao longo da sua evolução (GALBANDON et al., 2010).

Apesar de serem amplamente reconhecidas às características germicidas da luz UV e estas terem sido descritas para o tratamento específico de protozoários (WRIGHT et al., 1990), coincidentemente os grupos luz (GL: $P < 0,05$) e grupo luz + veículo (GL+V: $P < 0,005$), os quais foram também submetidos à irradiação UV, apresentaram uma diferença significativa nos valores de absorvância quando comparados com o grupo controle,

correspondentes estes a um aumento no número de parasitas em relação aqueles registrados pelo grupo controle (figura 1).

É importante ressaltar novamente que depois de estabelecidos os danos no DNA pela ação da luz UV, vários mecanismos nucleares e mitocondriais são ativados para o reparo imediato das lesões, entre estes mecanismos destaca-se a ação da DNA fotoliase, uma proteína nuclear que localiza o dano e desfazem os dímeros de timina (principal lesão da luz UV no DNA a qual impede a normal replicação do material genético) e o mecanismo de reparo tipo NER descrito anteriormente (BRETTEL e BYRDIN, 2010; SILVA et al., 2010).

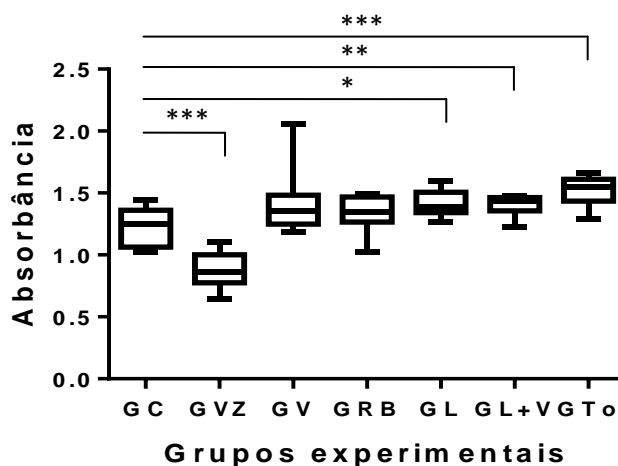


Figura 1. Teste de viabilidade celular MTT, registro dos valores de absorbância dos grupos experimentais: grupo controle (GC); grupo vazio (GVZ); grupo veículo (GV); grupo riboflavina (GRB); grupo luz (GL); grupo luz + veículo (GL + V); e grupo tratamento (GTo), após tratamento do EXPERIMENTO I. Os dados representam o efeito citotóxico imediato da associação de irradiação UV e riboflavina. Os valores são apresentados como mediana com seus respectivos valores mínimos e máximos. de acordo com o teste Mann Whitney (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ e *** $P < 0,0005$).

Quanto ao GC₁, este não evidenciou diminuição da concentração das epimastigotas, pelo fato de estas estarem diluídas apenas em meio de cultura LIT, meio que proporciona substrato para a multiplicação de ditas formas parasitárias (MELLO et al., 1980). Situação semelhante foi registrada nos grupos GV₁ e GRB₁, onde, pelas características dos diluentes, não houve

redução das epimastigotas. No caso da solução de cloreto de sódio a 0,9% usada no GV_I, esta não ofereceu um aporte energético para os parasitas, mas sim ofereceu um substrato de manutenção durante o período experimental (INFANTE et al., 2012). E no caso da solução de RB usada no GRB_I, esta não demonstrou ser uma solução de efeitos citotóxico nas epimastigotas (DE SOUZA et al., 2005).

Diante à discrepante diferença entre os resultados obtidos neste estudo e aqueles descritos na literatura, onde a redução da carga parasitária após tratamento se refere, é necessário ressaltar a diferença da forma parasitária do *T. cruzi* que recebeu o tratamento. Cardo et al., (2007) e Tonnetti et al., (2012), utilizaram as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, formas infectantes, mas com baixo índice de replicação. Enquanto que neste estudo foram submetidas à TFD as formas epimastigotas do parasita, formas com alto índice de replicação e de múltipla localização (intracelular e extracelular) nos organismos dos indivíduos infectados. Com base nos resultados obtidos poderíamos considerar que a TFD não exerce o mesmo efeito citotóxico nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, apresentam níveis de resistência com diferença significativa entre elas.

6.1.2. TESTE DE EXCLUSÃO CELULAR DO AZUL DE TRIPANI

Com o intuito de avaliar uma possível ação residual da TFD, 24 horas após os tratamentos foi avaliada a viabilidade celular das epimastigotas de todos os grupos experimentais, usando a técnica de exclusão celular de Azul de Tripán, considerando mortas aquelas que evidenciaram internalização do corante e viáveis aquelas que excluía o Azul de Tripán.

Como esperado, o resultados da viabilidade do grupo controle (**GC_I**) foi de 97,89%, sem registro de alteração na viabilidade celular das epimastigotas de *T. cruzi*, pelo fato de estas estarem diluídas apenas em meio de cultura LIT,

meio que proporciona substrato para a multiplicação das epimastigotas (MELLO et al.,1980).

Situação semelhante ao **GC_I** foi registrada nos grupos **GV_I** e **GRB_I** com resultados de viabilidade celular de 97,22 e 92,44% respectivamente (Figura 2), justificado pelas características dos diluentes, não foi observado efeito citotóxico residual. No caso da solução de cloreto de sódio a 0,9% usada no **GV_I**, esta não possui características tóxicas que exerçam efeito sobre as células durante o período experimental (INFANTE et al., 2012). E no caso da formulação de riboflavina usada no **GRB_I**, esta demonstrou ser uma solução bastante segura, já que isoladamente não promoveu efeito citotóxico nas epimastigotas (DE SOUZA et al., 2005).

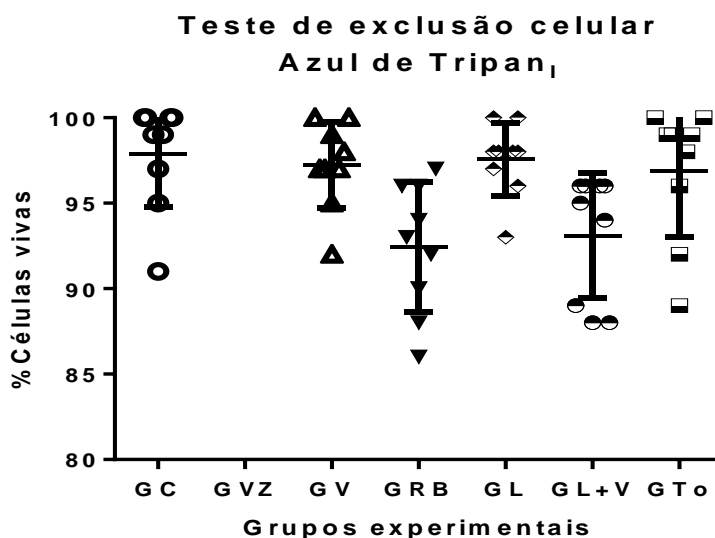


Figura 2. Valor percentual da viabilidade dos grupos experimentais 24 horas após tratamento EXPERIMENTOI. GC: grupo controle; GVZ: grupo vazio; GV: grupo veículo; GRB: grupo riboflavina; GL: grupo luz; GL + V: grupo luz + veículo; GTo: grupo tratamento. Os valores são apresentados como medianas com valores máximos e mínimos.

No caso dos grupos **GL_I** e **GL+V_I** a viabilidade celular foi de 97,56% e 93,11% respectivamente, resultados que não evidenciaram efeito citotóxico residual nas epimastigotas do *T. cruzi* quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, os resultados do grupo tratamento (**GTo_I**) foram

muito semelhantes aos descritos anteriormente, onde a viabilidade foi de 96,89% após 24 horas do tratamento sem evidência de diferença significativa quando comparado com o **GC_i** (Figura 2). Com este resultado foi possível observar que a associação de luz UV e RB não geram efeitos citotóxicos tardios, quando utilizado sobre as epimastigotas de *T. cruzi*.

Como os parasitos do GL e GL+V foram tratados com luz UV, acredita-se que após a lesão, mecanismos nucleares podem ter sido ativados para o reparo imediato das lesões. Entre estes mecanismos destaca-se a ação da DNA fotoliase, uma proteína nuclear que localiza o dano e removem os dímeros de timina, formados pelo efeito da luz UV no DNA, com o objetivo de impedir a normal replicação do material genético (BRETTEL e BYRDIN, 2010).

6.1.3. CINÉTICA DE REPLICAÇÃO EM MEIO LIT_i

Durante a avaliação da cinética de replicação após tratamento, foi possível acompanhar o aumento progressivo da concentração de parasitas em todos os grupos experimentais, exceto no grupo vazio (**GVZ_i**), onde não foram identificados parasitas durante o acompanhamento (Tabela 2). Esse resultado determina que o tratamento de irradiação UV associada à riboflavina não foi efetiva no controle da replicação.

Tabela 2: Cinética de replicação das epimastigotas de *T. cruzi* experimento I, em concentração de parasitas/mL, na 0 hora (0h); 48 horas (48h); 72 horas (72h); 96 horas (96h) e 120 horas (120h) após tratamento dos grupos: Controle (GC_i); Vazio (GVZ_i); Veículo (GV_i); Riboflavina (GRB_i); Luz (GL_i); Luz + Veículo (GL + V_i) e Grupo Tratamento (GTo_i).

Grupo	0h	48h	72h	96h	120h
GC_i	10x10 ⁶	8,66x10 ⁷	1,43 x10 ⁸	1,77 x10 ⁸	1,85x10 ⁸
GVZ_i	0	0	0	0	0
GV_i	10x10 ⁶	8,30x10 ⁷	1,86x10 ⁸	1,69x10 ⁸	1,55x10 ⁸
GRB_i	10x10 ⁶	7,55x10 ⁷	1,34x10 ⁸	1,44x10 ⁸	1,22x10 ⁸
GL_i	10x10 ⁶	1,48x10 ⁸	1,35x10 ⁸	1,23x10 ⁸	1,27x10 ⁸
GL+V_i	10x10 ⁶	1,55x10 ⁸	1,36x10 ⁸	1,55x10 ⁸	1,09x10 ⁸
GTo_i	10x10 ⁶	1,38x10 ⁸	1,71x10 ⁸	1,85x10 ⁸	1,19x10 ⁸

Como esperado, o **GC₁** continuou na fase de expansão logarítmica até o final do acompanhamento (Figura 3), pelo fato das epimastigotas estarem diluídas apenas em meio de cultura LIT, meio que proporciona substrato para a multiplicação das epimastigotas (MELLO et al., 1980).

Situação semelhante ao **GC₁** foi registrada nos grupos **GV₁** e **GRB₁**, onde as epimastigotas seguiram o padrão normal da replicação exponencial, isso justificado pelas características dos diluentes. No caso da solução de cloreto de sódio a 0,9% usada no **GV₁**, esta não possui características físico-químicas que exerçam interferência no ciclo celular (INFANTE et al., 2012). E no caso da formulação de RB usada no **GRB₁**, esta demonstrou ser uma solução bastante segura e pertencente ao grupo das vitaminas essenciais para os organismos com participação em vários processos celulares, esta substância não promoveu efeitos de interferência no ciclo celular (DE SOUZA et al., 2005).

Da mesma forma, os grupos **GL₁** e **GL+V₁** demonstraram replicação progressiva das epimastigotas de *T. cruzi*, resultados que não evidenciaram lesões permanentes no DNA que afetaram a multiplicação do parasita. Portanto se determinou-se que as lesões ocasionadas no DNA pela ação direta da luz UV foram do tipo reversível, dado que após a lesão, vários mecanismos de reparo do DNA são ativados imediatamente, entre estes mecanismos destaca-se a ação da DNA fotoliase, uma proteína nuclear que localiza o dano e removem os dímeros de timina, formados no DNA pela absorção da luz UV e que impede a normal replicação do material genético (BRETTEL e BYRDIN, 2010), e dos mecanismos nucleares do tipo NER (Reparo por Excisão de Nucleotídeos) que eliminam as porções de DNA comprometidos pela ação direta da luz UV (SILVA et al., 2010).

No **GTo₁**, foram observados resultados semelhantes aos descritos em todos os grupo, onde a curva de replicação teve também um aumento progressivo na concentração dos parasitas ao longo do período de avaliação (Figura 3). Com este resultado foi possível observar que a associação de Luz UV e riboflavina não impediu a replicação das epimastigotas de *T. cruzi*.

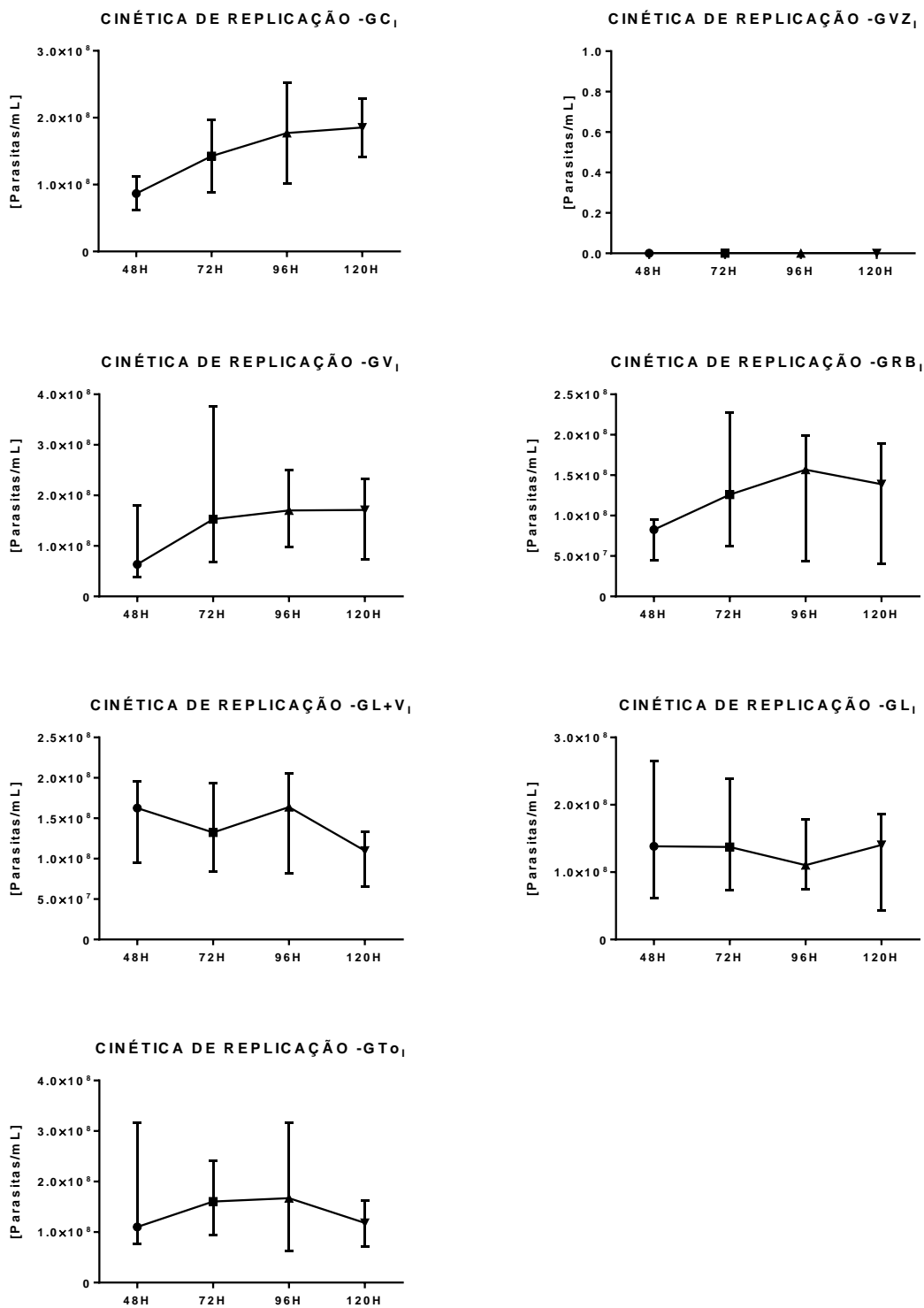


Figura 3. Cinética de replicação dos grupos experimentais após tratamento durante o período de acompanhamento EXPERIMENTO I. GC: grupo controle; GVZ: grupo vazio; GV: grupo

veículo; GRB: grupo riboflavina; GL: grupo luz; GL+V: grupo luz UV+veículo; GTo: grupo tratamento 48h: 48 horas; 72h: 72 horas; 96h: 96 horas; 120h: 120 horas.

6.2. EXPERIMENTO II

Com base nos resultados anteriormente descritos (EXPERIMENTO_I) e com o intuito de verificar o efeito da TFD na replicação das epimastigotas de *T. cruzi*, foi realizado um segundo experimento (EXPERIMENTO_{II}) aumentando o tempo da irradiação à luz UV de 35 minutos para 70 minutos, em apenas os grupos luz (**GL_{II}**), grupo luz + veículo (**GL_{II}+V**) e grupo tratamento (**GTo_{II}**), com um grupo controle (**GC_{II}**).

6.2.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – MTT_{II}

Novamente os dados foram interpretados a partir da análise da variação da absorbância entre os grupos tratados e o grupo controle. Os valores da absorbância do teste MTT_{II} dos grupos experimentais são apresentados pelo valor da mediana com seus respectivos valores mínimos e máximos, descritos na tabela 3.

Tabela 3: Resultado de absorbância do teste MTT_{II}, apresentados com os valores das medianas e seus respectivos valores máximos e mínimos, nos diferentes grupos experimentais submetidos a 70 minutos de irradiação.

Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle _{II}	0,976	0,786	1,411
Luz _{II}	0,958	0,853	1,128
Luz+veículo _{II}	1,031	0,909	1,422
Tratamento _{II}	1,049	0,898	1,890

Imediatamente após tratamento com o segundo protocolo de irradiação, 70 minutos foi feita a avaliação da citotoxicidade pelo teste colorimétrico MTT, a qual não identificou diferença significativa na redução ou completa eliminação dos parasitas do grupo **GTo_{II}** quando comparado com o grupo **GC_{II}** (Tabela 3). Como esperado, o **GC_{II}** não evidenciou diminuição dos parasitas pelo fato de

estas estarem diluídas no meio de cultura LIT, meio que proporciona substrato para a multiplicação das epimastigotas (MELLO et al., 1980).

No caso dos grupos **GL_{II}** e **GL+V_{II}**, mesmo aumentando o tempo de exposição à luz UV, não se registrou diminuição parcial ou total das epimastigotas nos grupos tratados. Este resultado respalda o fundamento da TFD o qual se baseia na potencialização dos efeitos da luz na presença de um fotossensibilizador, que em nosso caso foi a RB (PERUSSI, 2007). Além disso, é importante resaltar que depois de estabelecidos os danos no DNA pela ação da luz UV, vários mecanismos nucleares são ativados para o reparo imediato das lesões, entre estes mecanismos destaca-se a ação da DNA fotoliase, uma proteína nuclear que localiza o dano e desfazem os dímeros de timina, principal lesão da luz UV no DNA a qual impede a normal replicação do material genético (BRETTEL e BYRDIN, 2010). Com estes resultados pode se sugerir que, apesar do aumento do tempo de exposição à luz UV o grau de lesão não é suficiente para eliminar o parasita.

Resultados semelhantes foram observados no **GTo_{II}**, onde foi possível confirmar mediante o teste colorimétrico MTT_{II} que a associação de luz UV e RB, inclusive dobrando o tempo de exposição à luz UV, não exerce efeitos citotóxicos sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 4). TONNETTI et al., (2012) comprovaram a redução do *T. cruzi* de bolsas de sangue total contaminadas experimentalmente, neste trabalho os pesquisadores usaram doses de luz UV de até 110 J/mL_{RBC} associada a RB, o que sugere que o uso de fontes de luz mais potentes ou doses maiores de irradiação poderiam ser efetivas na eliminação das formas epimastigotas. Dada a resistência destas, observada neste estudo, lembrando que o teste de viabilidade celular MTT identifica atividade mitocondrial de células vivas por meio da transformação do sal de tetrazólio de cor amarelo em cristais de formação de cor violácea.

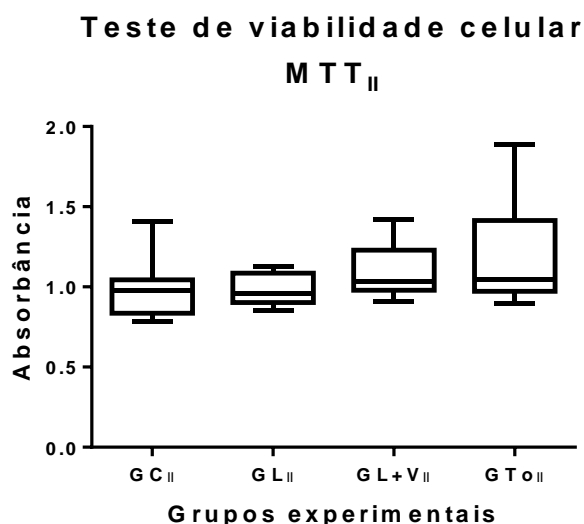


Figura 4. Teste de viabilidade celular MTT_{II}, registro dos valores de absorbância dos grupos experimentais: grupo controle (GC_{II}); grupo luz (GL_{II}); grupo luz UV+veículo (GL+V_{II}); e grupo tratamento (GT0_{II}), após tratamento EXPERIMENTO II. Os dados representam o efeito citotóxico imediato da associação de irradiação UV e riboflavina. Os valores são apresentados como mediana com seus respectivos valores mínimo e máximo.

6.2.1. TESTE DE EXCLUSÃO CELULAR DO AZUL DE TRIPAN_{II}

Seguindo o protocolo do primeiro experimento, 24 horas após tratamentos foi avaliada a viabilidade celular das epimastigotas de todos os grupos experimentais, usando a técnica de exclusão celular do Azul de Tripán, considerando mortas aquelas epimastigotas que evidenciaram internalização do corante e viáveis aquelas que excluía o azul de tripán.

Como esperado, os resultados da viabilidade do **GC_{II}** se mantiveram acima de 95%, sem registro de alteração na viabilidade celular das epimastigotas de *T. cruzi*, pelo fato de estas estarem diluídas apenas em meio de cultura LIT, meio que proporciona substrato para a multiplicação das epimastigotas (MELLO et al., 1980).

Situação semelhante ao **GC_{II}** foi observada nos grupos **GL_{II}** e **GL+V_{II}**, cujos resultados foram de 97,44 e 96,89% respectivamente (Figura 5), resultados que confirmam que o uso de luz UV não desenvolveu efeito citotóxico tardio

nas epimastigotas do *T. cruzi*. Pelo anterior observa-se que no caso de haver lesão no DNA pela ação direta da luz UV, esta é do tipo reversível, pois não foram detectados sinais que comprometessem a viabilidade das epimastigotas (BRETTEL e BYRDIN, 2010). Da mesma maneira que os grupos anteriormente descritos, o grupo **GToII** apresentou uma viabilidade de 97,56% após 24 horas do tratamento (Figura 5). Com este resultado foi possível observar que a TFD com a associação de luz UV e RB quando utilizada sobre epimastigotas de *T. cruzi* não possui efeito citotóxico residual.

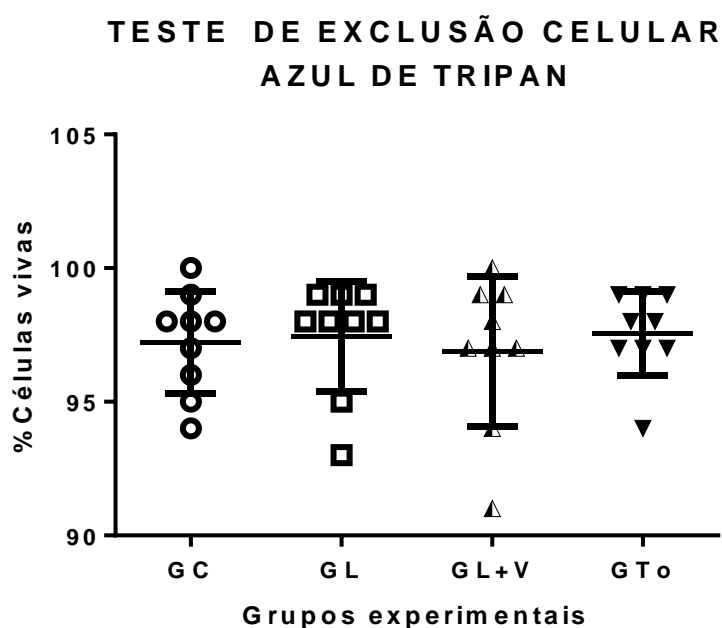


Figura 5. Valor percentual da viabilidade dos grupos experimentais 24 horas após tratamento EXPERIMENTOII. GC: grupo controle; GL: grupo luz; GL+V: grupo luz UV+veículo; GTo: grupo tratamento. Os valores são apresentados como medianas com valores mínimos e máximos.

6.2.2. CINÉTICA DE REPLICAÇÃO EM MEIO LIT_{II}

Durante a avaliação da cinética de replicação após tratamento, todos os grupos experimentais evidenciaram novamente aumento progressivo da concentração de epimastigotas, sinal de que o tratamento não foi efetivo no controle da replicação (Tabela 4). Como esperado, o **GC_{II}** continuou na fase de expansão logarítmica, pelo fato das epimastigotas estarem diluídas apenas em meio de cultura LIT, meio que proporciona substrato para a multiplicação das epimastigotas (MELLO et al., 1980).

Situação semelhante ao **GC_{II}** foi registrada nos grupos **GL_{II}** e **GL+V_{II}**, os quais demonstraram replicação progressiva do número de epimastigotas de *T. cruzi*. Este resultado permite sugerir que no caso de ocorrer lesão do DNA do parasita associada à exposição da luz UV, esta seja do tipo reversível, sendo rapidamente removida por diferentes mecanismos nucleares ativados para o reparo do DNA (BRETTEL E BYRDIN, 2010).

Tabela 4: Cinética de replicação das epimastigotas de *T. cruzi* experimento II, em concentração de parasitas/mL, na 0 hora (0h); 48 horas (48h); 72 horas (72h) e 96 horas (96h), após tratamento dos grupos: Controle (GC_{II}); luz (GL_{II}); luz + veículo (GL+V_{II}) e Grupo tratamento (GT_{0II}).

Grupo	0h	48h	72h	96h
GC_{II}	10x10 ⁶	3,14 x10 ⁷	4,50 x10 ⁷	2,71 x10 ⁷
GL_{II}	10x10 ⁶	3,09 x10 ⁷	3,62 x10 ⁷	1,67 x10 ⁷
GL+V_{II}	10x10 ⁶	3,15 x10 ⁷	3,41 x10 ⁷	1,05 x10 ⁷
GT_{0II}	10x10 ⁶	3,65 x10 ⁷	4,91 x10 ⁷	1,46 x10 ⁶

Finalmente, os resultados do **GT_{0II}** também não evidenciarem efeitos contundentes no controle de replicação do parasita, mesmo sendo dobrado o tempo de exposição da irradiação de 70 minutos ultravioleta (Figura 6). Com este resultado foi possível observar que a associação de Luz UV e RB sobre as

epimastigotas de *T. cruzi*, não gera um efeito direto que impeça a replicação do parasita.

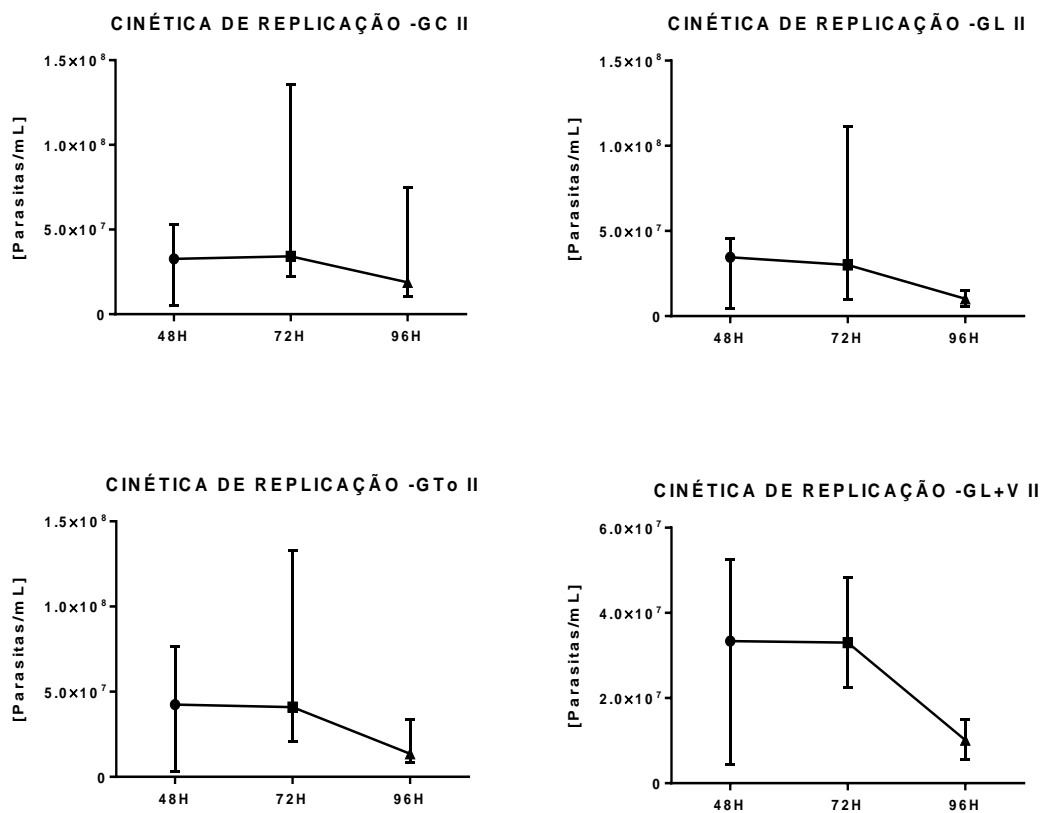


Figura 6. Cinética de replicação após tratamento dos grupos: Controle (GC_{II}); Luz (GL_{II}); Luz + Veículo (GL + V_{II}) e Grupo Tratamento (GT_o_{II}), em concentração de parasitas/mL, durante o período de acompanhamento do EXPERIMENTOII. 48 horas (48h); 72 horas (72h) e 96 horas (96h).

7. CONCLUSÕES

Este estudo, diante das condições em que foi realizado permitiu chegar à conclusão que o protocolo de terapia fotodinâmica de luz ultravioleta associada à riboflavina, não desenvolve efeitos citotóxicos imediatos ou tardios quando utilizada sobre epimastigotas de *T. cruzi*. O que sugere que o tipo de lesão provocada não é suficiente para a eliminação do protozoário, ou, que os mecanismos de reparo de DNA das epimastigotas são altamente efetivos.

Por outro lado, resultados da curva de replicação sugerem que a terapia fotodinâmica de luz ultravioleta associada à riboflavina exerce um estímulo importante na multiplicação das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para intentar elucidar o motivo pelo qual desse resultado, consideramos necessário aprofundar nos estudos deste protocolo com o intuito de avaliar e identificar as variáveis que influenciam a multiplicação do protozoário na forma evolutiva de epimastigota.

Temos a perspectiva que trabalhos posteriores utilizando modelos animais sensíveis para Doença de Chagas poderão ser realizados com o objetivo de verificar se a terapia fotodinâmica com a associação de luz ultravioleta e riboflavina, atenua a patogenicidade do parasita, quando utilizado sobre formas tripomastigotas do *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS

- Araújo A, Jansen A, Reinhard K, et al. (2009) Paleoparasitology of Chagas disease - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 9–16.
- Aufderheide A, Salo W, Maddena M, et al. (2004) A 9.000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 7, 2034–2039.
- Ault S. (2007) Chagas diseases and Neglected Diseases: Challenging poverty and exclusion, em AC Silveira, La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. *Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano*, 13-15.
- Barbosa A, Ferreira J, Arcanjo A, et al. (2015) Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop* 48, 27–33.
- Brener Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27, 347–382.
- Brettel K, Byrdin M. (2010) Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin Struct Biol* 20, 693–701.
- Briceño-León R, Galván J. (2007) The social determinants of Chagas disease and the transformation of Latin America, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 109-112.
- Çamur M, Ahsen V, Durmus M. (2011) The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and (III) phthalocyanines. *J Photoch Photobio B* 219, 217-227.
- Cardo L, Salata J, Mendez J, et al. (2007) Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci* 37, 131–137.
- Chagas C. (1909) Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
- Coura J, Junqueira A, Carvalho-Moreira C, et al. (2007) Uma visão sistêmica da endemia chagásica em AC Silveira, La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. *Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano*, 23-35.
- Coura J, Dias J. (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 31–40.
- Coura J, Viñas P. (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465, S6–S7.
- Dabus D. (2015) Inativação da *Borrelia anserina* pela ação da luz ultravioleta associada à riboflavina em soro sanguíneo de *Gallus gallus domesticus*. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.

De Souza A, Ferreira C, Jucá M, et al. (2005) Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova* 28, 887.

Devera R, Fernandes O, Coura J. (2003) Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 1–12.

Ferreira, H. (1990) Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. *Rev Soc Bras Med Trop* 23, 209–211.

Ferreira I, Silva T. (2006) Transmission elimination of Chagas’ disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. *Rev Soc Bras Med Trop* 39, 507–509.

Gabaldon C, Labrador L, Arraiz G, et al. (2010) *Trypanosoma cruzi*: A kinetoplast-associated protein of the Photolyase/cryptochrome Family. *Exp Parasitol* 124, 350-356.

Godínez G. (2012) Tripanosomiasis americana. Enfermedad de Chagas. Enfermedad de Chagas-Cruz. Enfermedad de Chagas-Mazza: historia de un epónimo. *Med Int Mex* 28, 182-186.

Gontijo E, Andrade G, Santos S, et al. (2009) Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiol Serv Saúde* 18, 243–254.

Goodrich R, Edrich R, Li J, et al. (2006) The Mirasol™ PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: An overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 35, 5–17.

Infante V, Cano A, Valdovinos H, et al. (2012) Solución salina como medio de cultivo desde el punto de vista de las bacteriemias nosocomiales. *Rev Invest Clin* 64, 120–125.

Issa M, Manela-Azulay M. (2010) Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An Bras Dermatol* 85, 501–51.

Kashiwabara Y, Paiva R, Nakaoka V, et al. (2013) Doença de Chagas-Revisão de literatura-. *Braz J Surg Clin Res* 4, 49-52.

Lewis M, Fortes A, Taylor M, et al. (2015) A New Experimental Model for Assessing Drug Efficacy against *Trypanosoma cruzi* Infection Based on Highly Sensitive In Vivo Imaging. *J Biomol Screen* 20, 36–43.

Lopes L. (2011) Avaliação da ação da riboflavina associada à radiação ultravioleta na ativação do *Anaplasma Marginale* em sangue bovino conservado para transfusão e estudo das alterações hematológicas e bioquímicas durante o período estocagem. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.

Matsuda N, Miller S, Evora P. (2009) The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease. *Clinics* 64, 1219-1224.

Martin D, Lowe K, McNeill T, et al. (2015) Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop* 149, 15–18.

Mello D, Borges M, Chairini L. (1980) Crescimento e diferenciação "In vitro" de cepas de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de animais silvestres. *Rev Saude Publica* 14, 569–581.

Ministério de Saúde - Portal da Saúde. Informações técnicas 2014. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-d-a-a-z/doenca-de-chagas/l2-doenca-de-chagas/11114-informacoes-tecnicas-chagas>. Data de consulta 20-11-2014. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/Data de consulta 20-02-2016.

Ministério de Saúde - Secretaria de vigilância em Saúde-Brasil. (2015) Boletim Epidemiológico Nº 21 Doença de Chagas Aguda no Brasil: Série histórica de 2000 a 2013, 46.

Moreno E, Araujo M, Alarcón M, et al. (2006) Efectos de la infección chagásica aguda en ratas wistar gestantes. *Revista Científica* 16.

OMS -Organización Mundial de la Salud, Enfermedad de Chagas: control y eliminación informe de la secretaria, 2008.

OMS -Organização Mundial da Saúde. Informações técnicas, 2016. disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>Data de consulta 20-02-2016.

Perussi J. (2007) Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, 30, 988.

Pontes V, Júnior A, Tavares da Cruz F, et al. (2010) Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceara. *Rev Soc Bras Med Trop* 43, 182–187.

Rassi A, Marin-Neto J. (2010) Chagas disease. *The Lancet*, 375, 1388–1402.

Reddy H, Dayan A, Cavagnaro J, et al. (2008) Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation. *Transfus Med Rev* 22, 133–153.

Ribeiro A, Rocha M. (1998) Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 31, 301–314.

Ruane P, Edrich R, Gamp D, et al. (2004) Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 44, 877–885.

Sacco S. (2013) Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão. Tese de doutorado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.

Silva D, Raijão M, Aguiar P, et al. (2010) Overview of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*, *trypanosoma 60 brucei* and *Leishmania major*. *J Nucleic Acid* 1, 1-14.

Schmunis G. (2007) Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 75–86.

Spickler A. (2009) Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas). The center food security & public health and institute for international cooperation in animals biologics.

Teixeira A, Hecht M, Guimaro M, et al. (2011) Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microb Rev* 24, 592–630.

Thielen E, Santos A. (2002) Belisário Penna: biographical photos. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 9, 387–404.

Tonnetti L, Thorp A, Reddy H, et al (2012) Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and ultraviolet light for whole blood. *Transfusion* 52, 409-416.

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

Wright B, Cairns W. (1990) Luz ultravioleta. Trojan Technologies Inc. Canadá.

Zingales B. (2011) *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia* 6b, 44-48.

9. TRABALHO CIENTÍFICO


Trabalho a ser enviado para a Revista Argentina de Microbiologia,
seguindo as normas http://www.elsevier.es/ficheros/NormOrga/372normas_eng.pdf

12 de septiembre de 2016
Botucatu, SP-Brasil.

Sres. Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología
Argentina

En mi carácter de autor responsable declaro que el resto de los autores han acordado que los represente frente a la RAM con respecto al envío del manuscrito Efecto de la radiación ultravioleta asociada a la riboflavina en epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* - estudio *In vitro*, y son responsables junto a mí de su contenido. Este trabajo (u otro de contenido similar) no ha sido publicado previamente ni está siendo considerado en otra revista para su publicación. Asimismo, manifiesto mi conformidad de otorgar los derechos de copia (*copyright*) a la Revista Argentina de Microbiologia, una vez concretada la publicación.

Atentamente:



Brayan Sayed López Castañeda
e-mail: brasayed@gmail.com

1 Título: Efecto de la radiación ultravioleta asociada a la riboflavina en epimastigotas de
2 *Trypanosoma cruzi* - estudio *in vitro*.

3 Title: Effect of ultraviolet radiation associated with riboflavin in epimastigotes of
4 *Trypanosoma cruzi* – study *in vitro*.

5 Título resumido: Terapia fotodinámica en *Trypanosoma cruzi*

6

7 Autores: Brayan López-Castañeda*, Raimundo Souza Lopes, Daniela Marques Maciel
8 Dabus, Leizinara Gonçalves Lopes.

9 *e-mail: brasayed@gmail.com

10

11 Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
12 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil. Rua Prof. Doutor Walter
13 Mauricio Correa s/nº - Caixa Postal 560 – CEP 18618-970 – Botucatu/SP –
14 Departamento Clínica Veterinária.

15

16 Financiamiento: “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” Proceso
17 FAPESP-2014/03353-4.

18 Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

19

20 Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de la “Fundação de
21 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” Proceso FAPESP-2014/03353-4, y los
22 recursos humanos y físicos ofrecidos por el laboratorio de zoonosis del departamento de
23 higiene veterinaria y salud pública de la FMVZ/UNESP-Botucatu/ Brasil.

1 **RESUMEN**

2 La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el *Trypanosoma cruzi*, un
3 protozoo flagelado que se transmite por múltiples vías y que se establece en la sangre
4 y órganos de los individuos infectados. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar
5 *in vitro* los efectos de la terapia fotodinámica utilizando la irradiación ultravioleta
6 asociada a la riboflavina sobre epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Para eso, los
7 protozoarios fueron tratados con riboflavina y posteriormente irradiados durante 35
8 minutos. Los resultados de los testes de viabilidad celular MTT y Azul de Tripano no
9 evidenciaron efectos citotóxicos inmediatos o tardíos, respectivamente, y durante el
10 acompañamiento de la curva de crecimiento tampoco se evidenció efectos sobre el
11 control en la replicación del parásito. Curiosamente, los resultados obtenidos del test
12 MTT indicaron que el grupo que recibió el tratamiento propuesto para este estudio,
13 aumentó significativamente ($P < 0,0005$) el número de protozoarios con respecto al grupo
14 control. Tales resultados fueron comprobados durante el acompañamiento de la curva de
15 crecimiento donde a las 48 horas, dicho grupo presentaba un aumento del 60% por
16 encima de los valores registrados en el grupo control. Con este estudio se pudo concluir
17 que la irradiación de luz ultravioleta asociada a la riboflavina, no es eficaz en el control
18 y/o eliminación de las formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Adicionalmente, se
19 sugiere el desarrollo de nuevos estudios para intentar identificar las variables que
20 influyen la multiplicación del protozoo.

21
22 **Palabras clave:** Enfermedad de Chagas; Epimastigotas; Riboflavina; Luz
23 ultravioleta; Terapia fotodinámica; *Trypanosoma cruzi*.

24

25

26 **ABSTRACT**

27 Chagas disease is a zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi*, a flagellated protozoan
28 which is transmitted through multiple routes and established in the blood and organs of
29 infected individuals. This study aimed to evaluate in vitro the effects of photodynamic
30 therapy using ultraviolet irradiation on riboflavin associated with epimastigotes of
31 *Trypanosoma cruzi*. For that, the protozoan were treated with riboflavin and
32 subsequently irradiated for 35 minutes. The results of the tests of cell viability MTT and
33 Trypan Blue showed no immediate or delayed cytotoxic effects, respectively, and
34 during the accompaniment of the growth curve nor effects on control parasite
35 replication it was revealed. Interestingly, the MTT test results indicate that the group
36 receiving the treatment proposed for this study, significantly increased ($P < 0.0005$) the
37 number of protozoan compared to the control group. These results were verified during
38 the accompaniment of the growth curve where at 48 hours, this group had an increase of
39 60% above those recorded in the control group values. With this study it can be
40 concluded that the ultraviolet light irradiation associated to riboflavin, is not effective in
41 the control and/or elimination of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes forms. Additionally,
42 the development of new studies is suggested to try to identify the variables that
43 influence the multiplication of the protozoan.

44

45 **Keywords:** Chagas disease; Epimastigote; Riboflavin; Ultraviolet light;
46 Photodynamic therapy; *Trypanosoma cruzi*.

47

48

49

50

51 **Introducción**

52 En la actualidad la enfermedad de Chagas se le reconoce como una infección sin
53 tratamiento y epidemiológicamente difícil de controlar. Es una zoonosis causada por el
54 *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), un protozooario flagelado que se transmite por múltiples
55 vías y que se establece en la sangre y órganos de los individuos infectados.⁴ Con el paso
56 del tiempo, el protozooario ha acumulado diversas características adaptativas que
57 dificultan su eliminación.

58

59 En los pacientes humanos, la enfermedad desarrolla un cuadro clínico de
60 sintomatología inespecífica con fiebre y malestar general (fase aguda) que acaba no
61 siendo considerado un motivo de consulta. Dicha negligencia permite que la infección
62 avance hasta la fase crónica, donde el individuo manifiesta signos y síntomas graves,
63 asociados a las fallas estructurales y funcionales cardiacas y/o del sistema digestivo^{4,10}

64

65 Como única alternativa eficaz de tratamiento para los pacientes infectados se tiene
66 el uso de fármacos con acción tripanocida, sin embargo, el tratamiento farmacológico ha
67 demostrado ser parcialmente efectivo en la fase aguda de la enfermedad y totalmente
68 ineficaz cuando utilizado en la fase crónica. Por otro lado, la disponibilidad e
69 accesibilidad a los fármacos en algunos países endémicos es limitada, disminuyendo
70 aun más las posibilidades de cura para las poblaciones comprometidas.¹³

71

72 Recientemente evidencias experimentales están demostrando que la terapia
73 fotodinámica (TFD) produce un importante efecto de control sobre diversos agentes
74 patógenos como virus, hongos, bacterias y protozoarios.¹⁵ La TFD surge en el inicio del
75 siglo pasado con el descubrimiento del efecto citotóxico de la luz en presencia de un

76 colorante, sobre una cultura de protozoarios de *Paramecium caudatum*.^{8,12} Actualmente
77 se define como una modalidad terapéutica que asocia sustancias fotosensibles y su
78 activación mediante diferentes fuentes de luz, para generar especies citotóxicas de
79 oxígeno y radicales libres de oxígeno, productos que inducen la destrucción de agentes
80 patógenos y células tumorales.²

81

82 El mecanismo de acción de la TFD está demarcado por el desarrollo de dos tipos de
83 reacción. Las reacciones tipo I están definidas por la formación de radicales libres de
84 oxígeno, producto de la transferencia de electrones entre la sustancia fotosensibilizadora
85 activada y el oxígeno presente en la célula. En cuanto que las reacciones tipo II, están
86 asociadas a la transferencia de energía del fotosensibilizador activado directamente al
87 oxígeno celular para la formación del oxígeno singlete, una molécula excitada que hace
88 reacción con todos los componentes celulares, principalmente los fosfolípidos que
89 forman las membranas celulares.¹²

90

91 El uso del protocolo que asocia luz ultravioleta y riboflavina está fundamentado en
92 la producción de daños irreversibles en el DNA del material sometido a tratamiento, el
93 cual compromete directamente los procesos de reparo y replicación.⁷ Adicionalmente,
94 las características de biodisponibilidad, perfil toxicológico y su actividad fotoquímica,
95 hacen de la riboflavina un fotosensibilizador de elección en la tentativa de reducción o
96 eliminación de los efectos colaterales de la TFD.¹²

97

98 Resultados anteriores demostraron que dita asociación provocaba la inmediata
99 reducción de la carga parasitaria de *Anaplasma marginale* en sangre de bovinos,
100 experimentalmente infectados.⁹ Usando un protocolo de TFD similar sobre un modelo

101 experimental *in vivo* de leishmaniosis, fue posible observar que la terapia además de
102 reducir la carga parasitaria, conseguía inhibir la presentación de la sintomatología.¹⁶

103

104 El objetivo de este trabajo fue el de evaluar los efectos de la TFD con el uso de la
105 luz ultravioleta asociada a riboflavina en la tentativa de reducción y/o eliminación *in*
106 *vitro* de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

107

108 **Materiales y métodos**

109 El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina
110 Veterinaria y Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil (CEUA número de protocolo
111 26/2016).

112

113 **DISEÑO EXPERIMENTAL**

114 **Cepa**

115 Fueron utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa Y, cedidas por el
116 laboratorio de zoonosis del departamento de higiene y salud pública de la facultad de
117 medicina veterinaria y Zootecnia de la Universidad Estadual Paulista, UNESP,
118 Botucatu.

119

120 **Agente fotosensibilizador**

121 Fue utilizada una solución de riboflavina (Vetec Química Fina Ltda, SP, Brasil) a
122 una dosis de 50µmol/mL,^{14,15} preparada a partir de un reactivo puro de riboflavina
123 diluido en solución salina al 0,9% y pH ajustado de 4,0 a 5,0. La solución fue
124 esterilizada en autoclave y almacenada en frascos color ámbar, como descrito por Ruane
125 et al., (2004), e Cardo et al., (2007).

126 **Dispositivo de luz ultravioleta**

127 Como fuente de luz para la irradiación de los grupos experimentales fue utilizada la
128 DNA Workstation (Loccus Biotecnologia®, SP, Brasil), una cabina equipada con
129 lámparas de luz ultravioleta de 365nm de longitud de onda. La dosis utilizada en el
130 presente estudio fue de 6,2J/mL, correspondiente a la descrita por Ruane et al., (2004)
131 como dosis efectiva en la reducción de patógenos.

132

133 Estudio anteriores validaron las capacidades del dispositivo de luz ultravioleta y
134 determinaron que el material a tratar, debía ser sometido a irradiación ininterrumpida
135 durante 35 minutos a una distancia de 17 cm de la fuente de luz.^{5,16}

136

137 **Ensayo de fototoxicidad**

138 Las condiciones experimentales de este estudio buscaban desafiar la asociación de
139 luz ultravioleta y riboflavina sobre una forma evolutiva del *T. cruzi* con alto índice de
140 replicación, mantenida en medio de cultura específico que favorece su multiplicación
141 (medio LIT) durante las fases pre, trans y pos irradiación. De esta forma, los posibles
142 efectos citotóxicos de la TFD serían validados.

143

144 Todos los ensayos de fototoxicidad fueron desarrollados en triplicatas biológicas
145 con sus respectivas triplicatas técnicas, utilizando siempre una concentración ajustada
146 de 10×10^6 epimastigotas de *T.cruzi*/mL en cada ensayo. Para validar los resultados, los
147 protozoarios fueron distribuidos en grupos correspondientes a cada una de las fracciones
148 que componen el protocolo de TFD propuesto para este estudio (Cuadro 1).

149

150 Los grupos experimentales fueron dispuestos en placas de cultivo celular de 12
151 pozos, donde fueron adicionados los tratamientos correspondientes hasta completar
152 2mL de volumen final. Luego, las placas fueron incubadas durante 15 minutos a
153 temperatura constante de 28°C e inmediatamente después los grupos que recibieron luz
154 ultravioleta como parte del tratamiento, fueron irradiados durante 35 minutos
155 ininterrumpidos e en movimiento constante, para eso, la placa de cultura celular fue
156 posicionados sobre un agitador de bolsas de sangre (HOMBOL-061, Benfer, SP,
157 Brasil).

158

159 **Teste de viabilidad celular Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-**
160 **difeniltetrazol (MTT)**

161 Para determinar el posible efecto citotóxico inmediato de la TFD sobre las
162 epimastigotas de *T. cruzi*, fue utilizado el método colorimétrico MTT, el cual identifica
163 la actividad mitocondrial de células vivas con la transformación de la sal de tetrazólio
164 de color amarillo en cristales de formazan de color violeta, los resultados son obtenidos
165 en valores de absorbancia.

166

167 Al término del tiempo de irradiación fueron transferidas alícuotas de 200µl a una
168 placa de 96 pozos, donde se adicionaron 50µl de MTT que previamente fue
169 reconstituido en PBS (phosphate buffered saline) en la concentración de 10mg/mL. La
170 placa fue protegida de la luz con papel aluminio y encubada a temperatura constante de
171 37°C durante 3 horas. Inmediatamente después, la placa fue centrifugada por 10
172 minutos a 2.000 rpm y el sobrenadante retirado cuidadosamente, seguido de la
173 resuspensión de los protozoarios en 20 µl solución SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%

174 en HCL 0,01M y un nuevo periodo de 24 horas de incubación a temperatura constante
175 de 37°C.

176

177 Pasadas las 24 horas, fueron adicionados 100µl de DMSO (dimetil sulfoxido) y
178 llevado nuevamente a incubación a 37°C hasta la solubilización completa de los
179 cristales de formazan. La lectura de la placa fue realizada utilizando un lector de Elisa
180 Bio rad, modelo 680 en la longitud de onda de 570nm.

181

182 **Test de viabilidad celular de Azul de Tripano**

183 Los grupos experimentales fueron analizados mediante el test de viabilidad celular
184 Azul de Tripano, 24 horas después de haber sido tratados. Este test diferencia las células
185 vivas de las muertas, a partir de su interacción con la tinción. Se consideran células
186 vivas aquellas que repelen la tinción, mientras que las células muertas evidencien una
187 coloración azul en su citoplasma.

188

189 Pasadas 24 horas, alícuotas de 50µl de cada uno de los grupos experimentales
190 fueron suspendidas en 50µl de Azul de Tripano al 2%. Los cálculos fueron
191 determinados mediante el conteo porcentual de los protozoarios, a partir de una gota de
192 la suspensión analizada por microscopia óptica convencional.

193

194 **Curva de replicación**

195 Alícuotas de 1mL fueron extraídas de cada uno de los grupos experimentales al
196 término del tiempo de irradiación para ser cultivadas en tubos de ensayo con tapa
197 conteniendo 4mL de medio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose) puro y fresco. Los
198 tubos fueron mantenidos a temperatura constante de 28°C por 5 días donde a cada 24

199 horas fue calculada la concentración de epimastigotas/mL, mediante la técnica de
200 cámara de Neubauer.

201

202 **Análisis estadística**

203 Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico (Prism 6,02;
204 GraphPad, San Diego, CA, EUA). La normalidad de la distribución de las variables fue
205 determinada por el test de Shapiro-Wilk, seguido de los test Kruskal-Wallis y el teste de
206 Mann Whitney, para comparación de las variables no paramétricos discutidas con un
207 nivel de 5% de significancia ($P < 0,05$).

208

209 **Resultados**

210 **Test de viabilidad celular MTT**

211 Cuando comparados los valores de absorbancia del grupo tratado con TFD
212 (mediana 1,546) y del grupo control (mediana 1,248), estos demuestran que no hubo
213 efecto citotóxico inmediato de la asociación de luz ultravioleta y riboflavina sobre
214 epimastigotas de *T. cruzi* (Figura1). Curiosamente los valores de absorbancia del grupo
215 tratado con TFD sugieren un aumento significativo en el número de formas vivas del
216 protozooario, cuando comparadas a los valores del grupo control ($P < 0,0005$). Datos
217 similares fueron observados en los grupos luz (GL: $P < 0,05$) y luz+vehículo (GL+V:
218 $P < 0,005$), los cuales también presentaron un aumento significativo de los valores de
219 absorbancia respecto aquellos del grupo control (Figura 1).

220

221 Como esperado, los grupos vehículo y riboflavina no registraron diferencias
222 significativas cuando comparadas al grupo control, esto debido a la naturaleza de los

223 sustratos (solución salina 0,9% y solución de riboflavina) los cuales no deben producir
224 efectos citotóxicos cuando utilizados de forma aislada.

225

226 **Test de viabilidad celular de Azul de Tripano**

227 Los resultados obtenidos del ensayo de exclusión celular de Azul de Tripano,
228 determinaron que no hay diferencia significativa entre el grupo tratado con la asociación
229 de luz ultravioleta y riboflavina (viabilidad de 96,89%), y el grupo control (viabilidad
230 de 97,89%). Esto indica que la TFD, con el uso de la asociación anteriormente descrita
231 no induce efectos citotóxicos tardíos sobre epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 2).

232

233 Resultados similares fueron observados en los demás grupos evaluados, los cuales
234 registraron valores de viabilidad celular por encima del 90%. Con estos resultados es
235 posible inferir que las diferentes fracciones que componen el protocolo de TFD, no
236 desarrollan actividad citotóxica tardía cuando utilizadas de forma aislada.

237

238 **Curva de replicación**

239 Durante la evaluación de la curva de replicación de las epimastigotas tratadas, fue
240 posible acompañar el aumento progresivo de la densidad de protozoarios en todos los
241 grupos experimentales, excepto en el grupo vacío por obvias razones (Tabla 1). Con
242 estos resultados se determinó que el tratamiento de irradiación ultravioleta asociado a la
243 riboflavina, no genera efectos sobre el control de la replicación del protozoario.

244

245 El cálculo de la densidad de protozoarios a las 48 horas pos-tratamiento, identificó
246 que, con respecto al grupo control, los grupos experimentales Luz; Luz + vehículo, e
247 grupo tratado, aumentaron el número de epimastigotas en un 72%, 80% e 60%

248 respectivamente. Estos resultados coinciden e sustentan aquellos obtenidos en el test de
249 viabilidad celular MTT, los cuales sugerían aumento en el número de formas vivas de
250 epimastigotas en los grupos que recibieron irradiación ultravioleta como parte del
251 tratamiento propuesto (Figura 3).

252

253 **Discusión**

254 Los datos obtenidos en este estudio resultan contrarios a lo descrito por Cardo et
255 al., (2007) y Tonnetti et al., (2012), quienes demostraron que el uso de la asociación de
256 luz ultravioleta y riboflavina, reducía considerablemente las tasas de replicación del *T.*
257 *cruzi* en unidades de plasma, concentrado de plaquetas y unidades de sangre total
258 humana, experimentalmente contaminados con el protozoario.

259

260 Frente a la discrepancia entre los resultados obtenidos en este estudio y aquellos
261 encontrados en la literatura, sugerimos que el protocolo terapéutico propuesto, no
262 provoca el mismo efecto citotóxico sobre las diferentes formas evolutivas del
263 protozoario *T. cruzi*, lo que indica que los niveles de resistencia a la acción germicida
264 de la luz ultravioleta potencializada con la asociación de riboflavina, son diferentes
265 entre ellas.

266

267 En el caso específico de las epimastigotas de *T. cruzi*, dicha resistencia estaría
268 mediada por los mecanismos de reparo del ADN de tipo NER (Reparo por Escisión de
269 Nucleotídeos),¹¹ y las dos copias del gen promotor de la expresión de la proteína
270 fotoliase, una proteína que elimina las lesiones producidas por la luz ultravioleta.^{1,6}

271

272 Por otro lado, el evidente aumento en el número de protozooario en los grupos
273 experimentales que recibieron irradiación ultravioleta como parte del tratamiento.
274 Creemos que la asociación de luz ultravioleta y riboflavina en las dosis propuestas para
275 este estudio, generaron una importante presión selectiva sobre las formas epimastigotas
276 de *T. cruzi*, que las llevó al desarrollo de resistencia al tratamiento y a la promoción de
277 la multiplicación del mismo, ambas vistas en este estudio.

278

279 **Conclusión**

280 Este estudio permitió concluir que la asociación de luz ultravioleta y riboflavina,
281 no desarrolla efectos citotóxicos inmediatos o tardíos cuando utilizado sobre
282 epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Por otro lado, consideramos necesario el
283 desarrollo de mas investigaciones para intentar identificar las variables que
284 influenciaron la multiplicación del protozooario en este estudio.

285

286 **Conflictos de interés**

287 Los autores declaran no tener conflictos de interés.

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297 **REFERENCIAS**

- 298 1. Brettel K, Byrdin M. Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin*
299 *Struct Biol* 20, 2010, p. 693–701.
- 300 2. Çamur M, Ahsen V, Durmus M. The first comparison of photophysical and
301 photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and
302 (III) phthalocyanines. *J Photoch Photobio B* 219, 2011, p. 217-227.
- 303 3. Cardo L, Salata J, Mendez J, et al. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi*
304 in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light.
305 *Transfus Apher Sci* 37, 2007, p. 131–137.
- 306 4. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo
307 evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova
308 entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1, 1909, p. 159-218.
- 309 5. Dabus D. Inativação da *Borrelia anserina* pela ação da luz ultravioleta associada
310 à riboflavina em soro sanguíneo de *Gallus gallus domesticus*. Tesis de maestria
311 2015. Universidad Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.
- 312 6. Gabaldon C, Labrador L, Arraiz G, Concepción JL, Avilan L. *Trypanosoma*
313 *cruzi*: A kinetoplast-associated protein of the Photolyase/cryptochrome Family.
314 *Exp Parasitol* 124, 2010, p. 350-356.
- 315 7. Goodrich R, Edrich R, Li J, et al. The Mirasol™ PRT system for pathogen
316 reduction of platelets and plasma: An overview of current status and future
317 trends. *Transfus Apher Sci* 35, 2006, p. 5–17.
- 318 8. Issa M, Manela-Azulay M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e
319 documentação iconográfica. *An Bras Dermatol* 85, 2010, p. 501–51.
- 320 9. Lopes L. Avaliação da ação da riboflavina associada à radiação ultravioleta na
321 ativação do *Anaplasma Marginale* em sangue bovino conservado para transfusão

- 322 e estudo das alterações hematológicas e bioquímicas durante o período
323 estocagem. Tesis de maestria 2011. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
324 Mesquita Filho", Botucatu, SP.
- 325 10. Ministério de Saúde - Secretaria de vigilância em Saúde-Brasil. Boletim
326 Epidemiológico Nº 21 Doença de Chagas Aguda no Brasil: Série histórica de
327 2000 a 2013, 2015, p. 46.
- 328 11. Passos-Silva D, Raijão M, Aguiar P, Viera-da-Rocha J, Machado C, Furtado C.
329 Overview of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*, *trypanosoma 60 brucei* and
330 *Leishmania major*. *J Nucleic Acid* 1, 2010, p. 1-14.
- 331 12. Perussi J. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, 2007, p.
332 988.
- 333 13. Pontes V, Júnior A, Tavares da Cruz F, Coelho HL, Dias AT, Coêlho IC
334 Oliveira MF. Adverse reactions in Chagas disease patients treated with
335 benznidazole, in the State of Ceara. *Rev Soc Bras Med Trop* 43, 2010, p. 182–
336 187.
- 337 14. Reddy H, Dayan A, Cavagnaro J, et al. Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-
338 Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation.
339 *Transfus Med Rev* 22, 2008, p. 133–153.
- 340 15. Ruane P, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP.
341 Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet
342 concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 44, 2004, p. 877–885.
- 343 16. Sacco S. Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania*
344 *infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão. Tesis
345 de doctorado 2013. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
346 Botucatu, SP.

- 347 17. Tonnetti L, Thorp AM, Reddy HL, Keil SD, Goodrich RP, Leiby DA.
348 Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and
349 ultraviolet lighth for whole blood. *Transfusion* 52, 2012, p. 409-416.

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367 Tablas:

368 Tabla 1: Curva de replicação de las epimastigotas de *T. cruzi* pos-tratamiento.

Grupo	0h	48h	72h	96h	120h
GCtrl	10×10^6	$8,66 \times 10^7$	$1,43 \times 10^8$	$1,77 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$
GVc	0	0	0	0	0
GVh	10×10^6	$8,30 \times 10^7$	$1,86 \times 10^8$	$1,69 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$
GRb	10×10^6	$7,55 \times 10^7$	$1,34 \times 10^8$	$1,44 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$
GLz	10×10^6	$1,48 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$	$1,23 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$
GLz + Vh	10×10^6	$1,55 \times 10^8$	$1,36 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$
GTFD	10×10^6	$1,38 \times 10^8$	$1,71 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$	$1,19 \times 10^8$

369

370 **Tabla 1:** Acompañamiento de la variación de la concentración de epimastigotas de
 371 *T. cruzi* pos-tratamientos, a partir de las 0 horas (0h); 48 horas (48h); 72 horas (72h); 96
 372 horas (96h) e 120 horas (120h), en los grupos experimentales controle (GCtrl); vacío
 373 (GVc); vehículo (GVh); riboflavina (GRb); luz (GLz); luz + vehículo (GLz + Vh); e
 374 grupo Terapia fotodinámica (GTFD).

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

1 **Cuadro 3.** Distribución de los grupos del protocolo 35 minutos de irradiación.

Grupo	Tratamiento
Grupo control (GCtrl)	Parásitos que no recibieron ningún tratamiento.
Grupo vacío (GVc)	Medio de cultivo LIT sin parásitos.
Grupo vehículo (GVh)	Parásitos que fueron incubados con el vehículo utilizado en la dilución de riboflavina (solución de cloruro de sodio 0.9%).
Grupo Riboflavina (GRb)	Parásitos incubados apenas con la solución de riboflavina en la concentración final de 50 $\mu\text{mol/mL}$
Grupo Luz (GLz)	Parásitos submetidos a irradiación unilateral de luz ultravioleta en la dosis de 6,2J/mL, con longitud de onda de 365nm durante 35 minutos.
Grupo Luz + vehículo (GLz+Vh)	Parásitos que fueron incubados con el vehículo en la dilución de riboflavina y de luz UV por 35 minutos.
Grupo Luz+ Riboflavina (GTFD)	Parásitos que recibieron la formulación de riboflavina hasta obtener una concentración final de 50 $\mu\text{mol/mL}$ y que después fueron irradiados con la fuente de luz UV por 35 minutos.

2

3

4

5

6

7

8

9

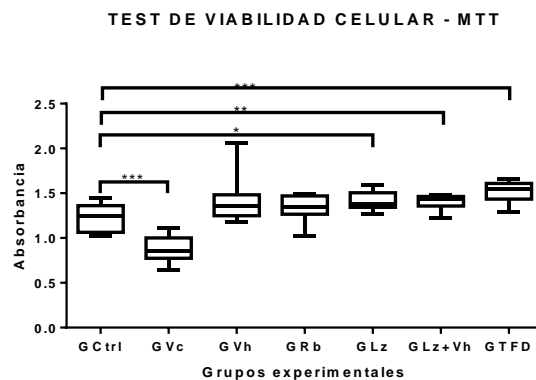
10

11

12

13

14

15 **Figura 1: Test de viabilidad celular - MTT**

16

17 **Figura 7.** Test de viabilidad celular-MTT, registro de los valores de absorbancia de los
 18 grupos experimentales controle (G Ctrl); vacio (GVc); vehículo (GVh); riboflavina
 19 (GRb); luz (GLz); luz + vehículo (GLz + Vh); e grupo Terapia fotodinámica (GTFD),
 20 des pues de haber recibido los tratamientos. Los datos representan el efecto citotóxico
 21 inmediato da asociación de luz ultravioleta e riboflavina. Os valores son presentados con
 22 las medianas con sus respectivos valores mínimos y máximos. Diferencia estadística
 23 según el test de Mann Whitney (*P<0,05; **P<0,005 y ***P<0,0005).

24

25

26

27

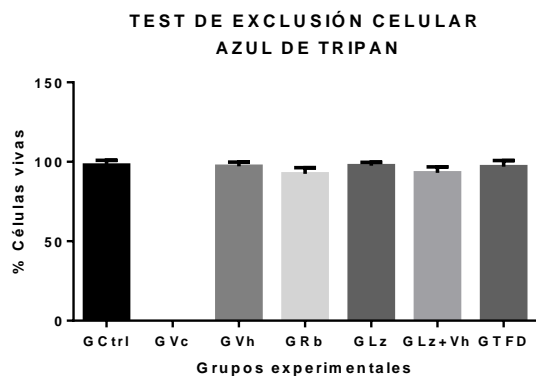
28

29

30

31

32 **Figura 2: Test de Exclusión celular – Azul de Tripano**



33

34 **Figura 8.** Test de exclusión celular – Azul de Tripano, Registro de los valores
 35 porcentuales de la viabilidad de los grupos experimentales controle (GCtrl); vacío
 36 (GVc); vehículo (GVh); riboflavina (GRb); luz (GLz); luz + vehículo (GLz + Vh); e
 37 grupo Terapia fotodinámica (GTFD), 24 horas pos-tratamientos. Los valores se
 38 presentan con respecto a la mediana con SUS valores mínimos y máximos.

39

40

41

42

43

44

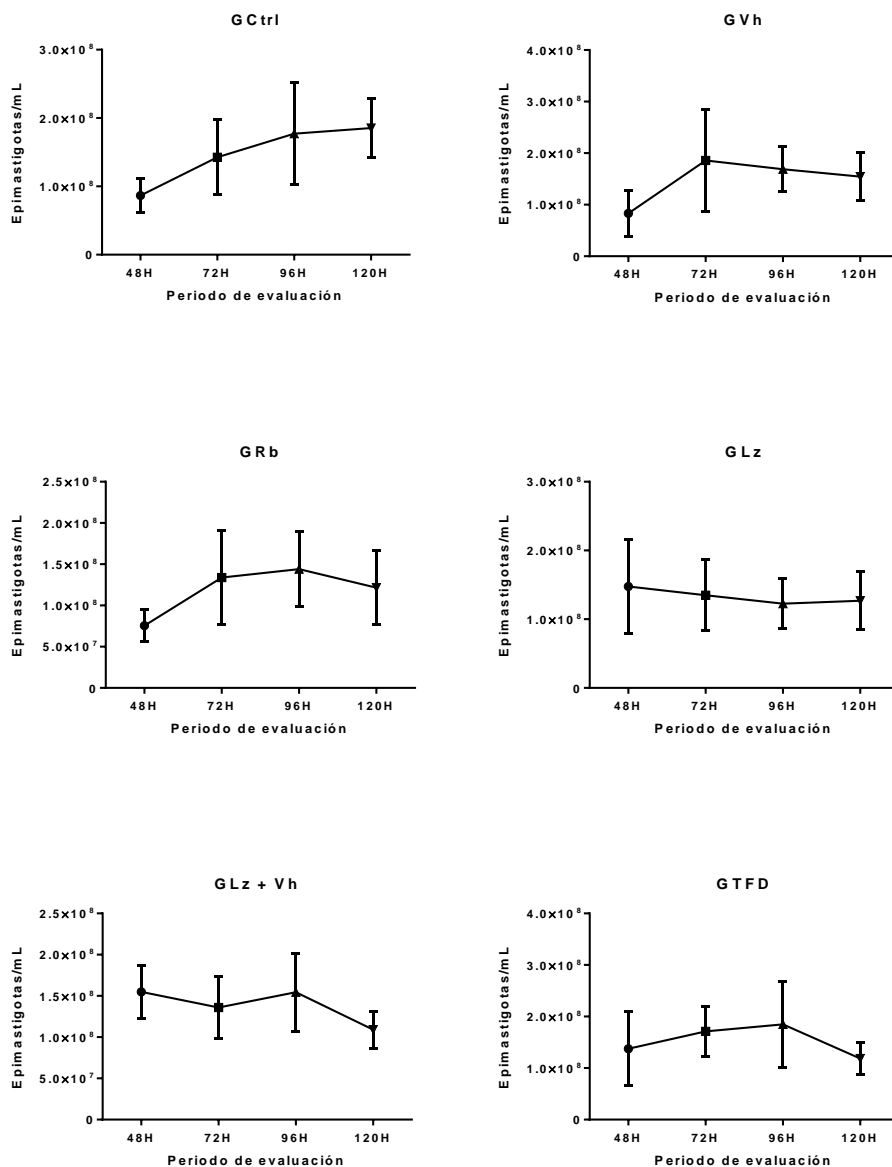
45

46

47

48

49

50 **Figura 3: Curva de crecimiento pos-tratamiento.**

51

52 **Figura 9.** Acompañamiento de la curva de crecimiento de las epimastigotas de *T. cruzi*
 53 pos-tratamientos, a partir de las 48 horas (48h); 72 horas (72h); 96 horas (96h) e 120
 54 horas (120h), en los grupos experimentales controle (GCtrl); vacío (GVc); vehículo
 55 (GVh); riboflavina (GRb); luz (GLz); luz + vehículo (GLz + Vh); e grupo Terapia
 56 fotodinámica (GTFD).

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

APÊNDICES

Apêndice A - Triplicatas biológicas - experimento I. Valores da concentração de parasitas/mL e viabilidade celular – Azul de Tripán, de cada uma das repetições antes de serem distribuídas nos grupos do experimento I.

Repetição	[Parasitas/mL]	Viabilidade – Azul de Tripán
1	$13,7 \times 10^6$	84%
2	$6,3 \times 10^6$	88%
3	$20,6 \times 10^6$	90%

Apêndice B – Viabilidade celular- teste MTT experimento I, valores de absorbância dos diferentes grupos experimentais obtidos imediatamente após tratamentos.

Grupo	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3			Média
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
GC	1,445	1,354	1,115	1,027	1,027	1,369	1,248	1,101	1,270	1,217
GVZ	0,807	0,846	1,107	0,645	0,877	0,858	1,018	0,984	0,743	0,876
GV	1,359	1,566	2,056	1,400	1,258	1,183	1,331	1,389	1,239	1,420
GRB	1,462	1,416	1,215	1,476	1,495	1,025	1,347	1,315	1,343	1,344
GL	1,434	1,418	1,357	1,328	1,368	1,385	1,578	1,266	1,594	1,414
GL+V	1,416	1,451	1,319	1,451	1,475	1,477	1,222	1,438	1,394	1,405
GTo	1,566	1,638	1,402	1,546	1,496	1,467	1,295	1,661	1,582	1,517

Apêndice C – Viabilidade celular, teste de exclusão celular do Azul de Tripán experimento I, (%) em epimastigotas de *T. cruzi* dos grupos experimentais 24 horas após tratamento.

Grupo	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3			Média
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
GC	99	100	100	100	99	100	91	97	95	97,89
GVZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97,22
GV	95	97	97	100	99	100	97	92	98	97,22
GRB	88	92	86	96	96	93	94	97	90	92,44
GL	97	98	100	96	100	98	98	98	93	97,56
GL+V	88	96	96	89	94	96	95	88	96	93,11
GTo	100	99	99	98	99	100	89	92	96	96,89

Apêndice C – Curva de replicação de epimastigotas (parasitas/mL) de *T. cruzi* ao longo de cinco dias experimento I, apresentada como mediana individual de medidas em triplicata para cada grupo experimental.

Grupo	Tempo			
	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
GC	$8,66 \times 10^7$	$1,43 \times 10^8$	$1,77 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$
GVZ	0	0	0	0
GV	$8,30 \times 10^7$	$1,86 \times 10^8$	$1,69 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$
GRB	$7,55 \times 10^8$	$1,34 \times 10^8$	$1,44 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$
GL	$1,48 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$	$1,23 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$
GL+V	$1,55 \times 10^8$	$1,36 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$
GTo	$1,38 \times 10^8$	$1,71 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$	$1,19 \times 10^8$

Apêndice D- Triplicatas biológicas - experimento II. Valores da concentração de parasitas/mL e viabilidade celular – Azul de Tripán, de cada uma das repetições antes de serem distribuídas nos grupos do experimento II.

Repetição	[Parasitas/mL]	Viabilidade – Azul de Tripán
1	23×10^6	90%
2	37×10^6	82%
3	58×10^6	96%

Apêndice E – Viabilidade celular, teste MTT experimento II, valores de absorbância dos diferentes grupos experimentais obtidos imediatamente após tratamentos.

Grupo	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
GC	0,880	0,792	0,929	0,786	0,977	1,086	0,976	1,411	1,002
GL	1,087	0,958	1,083	0,853	0,923	0,953	1,035	1,128	0,882
GL+V	1,027	1,422	1,346	1,031	0,909	1,061	0,980	0,979	1,111
GTo	0,898	1,496	1,195	1,016	1,049	0,950	0,996	1,890	1,333

Apêndice F – Viabilidade celular, teste de exclusão celular Azul de Tripán experimento II (%) em epimastigotas de *T. cruzi* após desafio dos grupos experimentais 24 horas após tratamento.

Grupo	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
GC	94	96	100	98	98	95	97	98	99
GL	93	98	95	98	99	99	99	98	98
GL+V	91	97	94	98	97	99	100	99	97
GTo	99	97	97	94	97	99	98	99	98

Apêndice G – Curva de replicação de epimastigotas (parasitas/mL) de *T. cruzi* após desafio experimento II, apresentada como mediana individual de medidas em triplicata para cada grupo experimental.

Grupo	Tempo		
	48 horas	72 horas	96 horas
GC	3,14 x10 ⁷	4,50 x10 ⁷	2,71 x10 ⁷
GL	3,09 x10 ⁷	3,62 x10 ⁷	1,67 x10 ⁷
GL+V	3,15 x10 ⁷	3,41 x10 ⁷	1,05 x10 ⁷
GTo	3,65 x10 ⁷	4,91 x10 ⁷	1,46 x10 ⁷