

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/06/2018.

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 absorvância 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 absorvância 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 (GToll), 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).

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.

Gabalton 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.