



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE FÁRMACOS
ANTI-*TRYPANOSOMA* UTILIZANDO CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS

DIOGO CRISPIM NASCIMENTO PORTELLA

Salvador – Bahia

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO *IN VITRO* PARA TRIAGEM DE
FÁRMACOS ANTI-*TRYPANOSOMA* UTILIZANDO CARDIOMIÓCITOS
DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS**

DIOGO CRISPIM NASCIMENTO PORTELLA

Orientador: Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Co-orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P843p Portella, Diogo.
Padronização de um ensaio *in vitro* para triagem de fármacos anti-*Trypanosoma* utilizando cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas / Diogo Portella. - 2018.
77 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Solano de Freitas Souza, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz 2018.

1. Cardiomiócitos. 2. Cardiotoxicidade. 3. *T. cruzi*. I. Título.

CDU 616.937

"PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IN VITRO PARA TRIAGEM DE FÁRMACOS ANTI-TRYPANOSOMA CRUZI UTILIZANDO CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS."

DIOGO CRISPIM NASCIMENTO PORTELLA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 12 de novembro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Fa R F7.

Dr. Fabio Rocha Formiga
Pesquisador
FIOCRUZ

Vasconcelos

Dra. Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos
Professora Adjunta
UFBA

Valéria de Matos Borges

Dra. Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos guias espirituais, por me permitirem alcançar mais um objetivo.

Às minhas avós, Maria de Lourdes e Astrogilda Portella, por serem meus pilares, pelas sábias palavras, apoio, por serem exemplos e inspiração de ser humano que almejo ser, pelas orações e incontáveis “Deus te abençoe”.

A meu orientador, Bruno Solano, por ter acreditado e me dado oportunidade. A ele devo todo o conhecimento e crescimento adquirido nessa caminhada, além de ter sido o maior incentivador e colaborador deste trabalho. Agradeço, também, pela dedicação, paciência e amizade.

Ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, bem como os representantes do centro, Dra. Milena Soares e Dr. Ricardo Ribeiro.

Aos meus amigos e colegas do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, especialmente a Iasmim Orge, Gabriela Sampaio, Patrícia Kauanna, Daniela Nascimento, Otavio Fernandes e aos colaboradores Bruno Paredes, Carine Machado, Luciana Aragão, Vinicius Rocha, Tanira Matutino e Cássio Meira.

A todos os professores, desde os meus primeiros anos escolares aos dias atuais, por terem transmitido seus conhecimentos e pelo incentivo dispensado.

A todos os membros da biblioteca do IGM pelo apoio e suporte na revisão do presente trabalho.

“O esforço é grande e o homem é pequeno.

Eu, Diogo Cão, navegador, deixei este padrão
ao pé do areal moreno e para diante naveguei (...)

Fernando Pessoa

PORTELLA, Diogo. Padronização de um ensaio *in vitro* para triagem de fármacos anti-*Trypanosoma* utilizando cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas. 2018. 77 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença de Chagas é causada pela infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* e continua sendo um grave problema de saúde na América Latina. As opções terapêuticas para a doença de Chagas são limitadas, com apenas dois medicamentos aprovados para uso. A cardiotoxicidade não prevista nas fases de desenvolvimento de novas drogas é a maior causa de retirada de medicamentos do mercado. A utilização de cardiomiócitos humanos produzidos a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-CM) pode auxiliar no desenvolvimento farmacológico através do estabelecimento de ensaios mais preditivos do que a utilização de linhagens imortalizadas ou células de animais. **OBJETIVOS:** Neste estudo utilizamos cardiomiócitos humanos produzidos a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-CM), objetivando avaliar simultaneamente a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e a citotoxicidade de compostos químicos selecionados. **MÉTODOS:** Foram utilizados nos ensaios hiPSC-CM produzidos a partir da diferenciação celular de linhagens de células-tronco obtidas de três doadores. Três compostos previamente avaliados quanto à atividade anti-*T. cruzi* - BA5 (derivado do ácido betulínico), GT5A e GT5B (derivados tiazolidínicos) - foram avaliados, utilizando o benzonidazol como controle. As células foram infectadas com *T. cruzi* (cepa Y) e incubadas por 48 h com diluições seriadas dos compostos para determinação dos valores de EC₅₀ e CC₅₀. Medidas de toxicidade subletal, incluindo avaliação do citoesqueleto por coloração com faloidina, de mitocôndrias utilizando mitotracker e dosagens de BNP, marcador de estresse cardíaco, foram incluídas no ensaio. Análise multiparamétrica automatizada foram realizadas no sistema Operetta HCS. **RESULTADOS:** A diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos teve eficiência de 83% quanto à expressão de troponina T cardíaca. O benzonidazol apresentou EC₅₀ = 6,1 µM e CC₅₀ > 100 µM. O BA5 apresentou EC₅₀ = 3,2 µM e CC₅₀ = 37 µM, o GT5A apresentou EC₅₀ = 1,9 µM e CC₅₀ = 87 µM, enquanto que o GT5B apresentou EC₅₀ = 0,08 µM e CC₅₀ = 27 µM. Análises de toxicidade subletal revelaram uma redução da intensidade de fluorescência compatível com a toxicidade mitocondrial, observada pela coloração de mitotracker, para doxorubicina e BA5 após 1 h de incubação, enquanto a biomassa mitocondrial estava aumentada 48 h após a incubação com os compostos. A redução na marcação de faloidina foi observada com BA5 e doxorubicina após 48 h de incubação. Níveis aumentados de BNP foram observados com o tratamento com BA5. **CONCLUSÃO:** A utilização de hiPSC-CM no fluxo de trabalho de desenvolvimento de fármacos para a doença de Chagas pode auxiliar na identificação de novos compostos. O ensaio mostrou-se viável por permitir avaliar rapidamente a ação anti-*T. cruzi* dos compostos, além de parâmetros de cardiotoxicidade, que podem aumentar o valor preditivo dos testes. Novos estudos serão necessários para que este ensaio seja aprimorado e validado quanto ao seu poder preditivo.

Palavras-Chave: iPSCs; Cardiomiócitos; cardiotoxicidade; *T. cruzi*

PORTELLA, Diogo. Standardization of an *in vitro* assay for anti-*Trypanosoma* drugs screening using cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. 2018. 77 f. il. Dissertation (Master em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

Background: Chagas disease is caused by chronic infection with *Trypanosoma cruzi* and remains a serious health problem in Latin America. Therapeutic options for Chagas disease are limited, with only two drugs approved for use. Unpredicted cardiotoxicity in the development stages of new drugs is the major cause of drug withdrawal on the market. The use of human cardiomyocytes produced from induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM) may help in pharmacological development by establishing more predictive assays than the use of immortalized lineages or animal cells. **AIM:** In this study we used human cardiomyocytes produced from induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM), aiming at simultaneously evaluating the anti-*Trypanosoma cruzi* activity and the cytotoxicity of selected chemical compounds.

Methods: hiPSC-CM assays were performed using cells from three donors. Three compounds previously screened for anti-*T. cruzi* activity - BA5 (derived from betulinic acid), GT5A and GT5B (thiazolidine derivatives) - were evaluated using benzonidazole as a control. Cells were infected with *T. cruzi* (Y strain) and incubated for 48 h with serial dilutions of the compounds for determination of EC₅₀ and CC₅₀ values. Sublethal toxicity measurements, including cytoskeletal evaluation by phalloidin staining, of mitochondria using mitotracker and dosages of BNP, cardiac stress marker, were included in the assay. Automated multiparametric analyses were performed on the Operetta HCS system. **Results:** The differentiation of hiPSC in cardiomyocytes had an efficiency of 83% for cardiac troponin T expression. Benzonidazole showed IC₅₀ = 6.1 µM and CC₅₀ > 100 µM. BA5 had EC₅₀ = 3.2 µM and CC₅₀ = 37 µM, GT5A had EC₅₀ = 1.9 µM and CC₅₀ = 87 µM, while GT5B had EC₅₀ = 0.08 µM and CC₅₀ = 27 µM. Sublethal toxicity analyzes revealed a reduction in mitochondrial toxicity compatible with mitochondrial toxicity observed by mitotracker staining for doxorubicin and BA5 after 1 h of incubation, while mitochondrial biomass was increased 48 h after incubation with the compounds. The reduction in phalloidin labeling was observed with BA5 and doxorubicin after 48 h of incubation. Increased levels of BNP were observed with treatment with BA5. **Conclusion:** The utilization of hiPSC-CM in the drug development workflow for Chagas disease may help in the identification of novel compounds. The assay was shown to be feasible because it allows rapid assessment of the anti-*T. cruzi* action of the compounds, in addition to cardiotoxicity parameters, which may increase the predictive value of the tests. Further studies will be required for this assay to be improved and validate for its predictive power.

Keywords: iPSCs; Cardiomyocytes; Cardiotoxicity; *T. cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> , o agente causal da doença de Chagas.....	20
Figura 2: Gráfico de fluxo projetado como um protocolo geral e padronizado de drogas testes aplicado à quimioterapia para a doença de Chagas.	26
Figura 3: Estrutura química básica das tiossemicarbazonas	28
Figura 4: Estrutura química das tiazolidinonas.....	28
Figura 5: Esquema comparando a citotoxicidade e atividade anti- <i>T. cruzi</i> do ácido betulínico e seu derivado BA5	29
Figura 6: Possíveis aplicações de cardiomiócitos derivados de iPSCs.....	34
Figura 7: Padronização da análise de imagens no Operetta High Content System. .	44
Figura 8: Caracterização de duas linhagens de iPSCs por Citometria de Fluxo.	49
Figura 9: Caracterização das linhagens de hiPSC utilizadas no estudo quanto à expressão dos marcadores de pluripotência analisados por microscopia confocal.....	50
Figura 10: Etapas da diferenciação cardíaca visualizadas por microscopia de contraste de fase.....	52
Figura 11: Expressão de troponina T cardíaca em hiPSC-CM avaliada por citometria de fluxo.	53
Figura 12: Padronização do protocolo de infecção de hiPSC-CM com <i>T. cruzi</i>	54
Figura 13: Avaliação da ação do benzonidazol em hiPSC-CM infectados com <i>T. cruzi</i>	55
Figura 14: Análises de toxicidade subletal através de marcação do citoesqueleto e dosagem de BNP	57
Figura 15: Intensidade de fluorescência da faloidina (Actina F)	58
Figura 16: Avaliação dos níveis de NT-pro-BNP no sobrenadante das culturas de hiPSC-CM	59
Figura 17: Avaliação de toxicidade mitocondrial após incubação de hiPSC-CM com doxorubicina	60
Figura 18: Avaliação de toxicidade mitocondrial após 1 hora de tratamento com os compostos	60
Figura 19: Avaliação de toxicidade mitocondrial após 48 horas de tratamento com os compostos	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização por citometria de fluxo e Imunofluorescência de hiPSC e hiPSC-CM.....40
- Tabela 2:** EC₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade dos compostos54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APs	Aspártico-peptidases
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Ácido betulínico
BMPs	Proteína morfogenética óssea
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CMH	Cardiomiopatia hipertrófica
CPs	Cisteína peptidases
cTnI	Troponina I cardíaca
cTnT	Troponina cardíaca T
DIC	Cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina
ET-1	Endotelina-1
FGFs	Fatores de crescimento de fibroblastos
gp57/51	Cruzaína
HCS	<i>High-content screening</i> (Triagem de alto conteúdo)
hESC	Células-tronco embrionárias humanas
hFIB	Fibroblastos humanos
hFIB	Fibroblastos humanos
hiPSC-CM	Cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas pluripotentes induzidas
hiPSCs	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas Humanas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1	Anti-Herpes Simplex Vírus-1
EC ₅₀	Concentração Inibitória para 50% das células
IFN- γ	Interferon Gama
IL-1 β	Interleucina-1 β
iPSCs	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas
LQTS	Síndrome do QT Longo
MEFs	Fibroblastos Embrionários de Camundongos
MIP2	Proteína Inflamatória de Macrófagos 2

MOI	Multiplicidade de Infecção
MPs	Metalo Peptidases
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-Cinase
PV	Vacúolo Parasitóforo
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
SPs	Serina Peptidases
TcAtg4	Autofagina-4
TccatB	Catepsina B
TGF	Fator de Crescimento e Transformação
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento B
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TrKA	Tirosina Cinase
WNTs	<i>Wingless/INT</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	A DOENÇA DE CHAGAS	16
2.1.1	Ciclo biológico e modos de transmissão do <i>T. cruzi</i>	16
2.1.2	Apresentação clínica	18
2.1.3	Tratamentos disponíveis	19
2.2	MODELO DE ESTUDO DE INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	20
2.3	TRIAGEM DE DROGAS ANTI- <i>T. cruzi</i>	24
2.3.1	Caracterização bioquímica do <i>T-cruzi</i> e compostos com ação tripanocida	25
2.4	CÉLULAS-TRONCO	28
2.5	APLICAÇÕES DAS iPSCs	29
2.6	DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA	29
2.6.1	Aplicação de cardiomiócitos derivados de ipsc em modelos <i>in vitro</i> de doenças	30
2.7	MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES DE CARDIOTOXICIDADE	34
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	40
4.2	CULTIVO DE IPSC	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS IPSC	38
4.3.1	Citometria de fluxo	40
4.3.2	Imunofluorescência	39
4.4	PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO EM CARDIOMIÓCITOS	43
4.5	OPERETTA HIGH-CONTENT IMAGING SYSTEM	41
4.5.1	Padronização da análise de imagens no <i>Operetta High Content System</i>.	43
4.5.2	Triagem de compostos aplicando ensaio de alto rendimento com o <i>Operetta High Content System</i>	45

4.6	QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO B (BNP)	45
4.7	CULTIVO DE <i>T. CRUZI</i>	46
4.8	MODELO DE INFECÇÃO E TESTES DE DROGAS	46
4.9	PADRONIZAÇÃO DE INFECÇÃO E TESTES DE DROGAS <i>ANTI-T. cruzi</i> EM CARDIOMIÓCITOS	47
4.10	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS.....	48
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	48
5	RESULTADOS	49
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS- hiPSC	49
5.2	DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA.....	51
5.3	PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO E ENSAIO FARMACOLÓGICO.....	53
5.4	TRIAGEM DE COMPOSTOS <i>ANTI-T. cruzi</i> EM hiPSC-CM.....	55
5.5	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE SUBLETAL	56
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina (FLORES-CHAVEZ et al., 2018; BERN, 2011). Durante a fase crônica da infecção, o acometimento cardíaco ocorre em até 30% dos casos, levando à cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). A doença de Chagas permanece como uma das etiologias mais frequentes dentre os óbitos por insuficiência cardíaca na América Latina (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO, 2001). A terapia definitiva para os pacientes com CCC grave é o transplante cardíaco, opção limitada pela baixa disponibilidade de órgãos e complicada pelo risco de reagudização da doença induzida pelo uso de imunossupressores (CHIARI; 1997).

Atualmente as opções terapêuticas para a doença de Chagas são limitadas, já que apenas duas drogas são aprovadas, o benznidazol (BNZ) e o nifurtimox, ambas com eficácia comprovada apenas quando administradas durante a fase aguda da doença (BERN, 2011). Esta é uma importante limitação das opções terapêuticas para a doença de Chagas, que frequentemente não é diagnosticada durante a fase aguda. Além disso, o tratamento é associado a sérios efeitos adversos em um significativo percentual dos pacientes tratados (LONGO; BERN, 2015). Diante destes fatores, existe uma necessidade urgente do desenvolvimento de novos medicamentos mais seguros e eficazes para o tratamento da doença de Chagas (BERN, 2011; HALL; 2012). A incorporação de abordagens inovadoras no processo de triagem pré-clínica *in vitro* de drogas anti-*T. cruzi* pode contribuir para aumentar a capacidade preditiva destes ensaios, tanto em relação à eficácia, quanto à toxicidade.

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) têm, nos últimos anos, contribuído para a descoberta de drogas e estudos toxicológicos, com aplicações em diferentes doenças, como as cardiovasculares. Células-tronco são células não-especializadas capazes de realizar divisões assimétricas, isto é, de dar origem a células especializadas e ao mesmo tempo, manter um conjunto de células

indiferenciadas (SURENDRAN; SIVAMURTHY, 2015). Através de um processo conhecido como reprogramação celular, é possível transformar células somáticas em células pluripotentes, ou iPSCs, que se assemelham às células-tronco embrionárias encontradas nas fases iniciais do desenvolvimento (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). As iPSC podem se diferenciar em qualquer tipo celular adulto, incluindo cardiomiócitos, representando assim uma excelente fonte para obtenção destas células e aplicações em pesquisa cardiovascular, modelagem de doenças, triagem de cardiotoxicidade e descoberta de drogas (COHEN et al., 2008).

Considerando que a infecção de cardiomiócitos e a persistência do parasito no coração são fatores centrais na fisiopatologia da doença de Chagas, a utilização de cardiomiócitos humanos produzidos a partir de iPSC pode ter aplicações em estudos visando ao melhor entendimento da patogênese da doença, bem como no processo de desenvolvimento de novas drogas, através da avaliação pré-clínica de toxicidade e eficácia (DRAWNEL et al., 2014). Um fator limitante na estratégia atual de desenvolvimento de drogas, de um modo geral, é a baixa capacidade dos atuais ensaios toxicológicos em prever cardiotoxicidade (SINNECKER et al., 2014). A cardiotoxicidade não prevista durante o desenvolvimento farmacológico é uma das principais causas de retirada de drogas do mercado e decorre do baixo valor preditivo da utilização de testes em animais que, em nível dos cardiomiócitos, apresentam significativas diferenças genéticas e funcionais, quando comparados aos cardiomiócitos humanos (GINTANT, 2016). A utilização de cardiomiócitos humanos derivados de iPSCs (iPSC-CM) oferece a possibilidade de, simultaneamente, avaliar a ação de fármacos quanto à atividade tripanocida e quanto à cardiotoxicidade em uma estratégia inovadora para a triagem de drogas e desenvolvimento farmacológico para o tratamento da doença de Chagas.

Devido à existência de poucas opções terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas e tendo em vista que os modelos atuais de estudos *in vitro* não serem os ideais para prever a cardiotoxicidade, principal causa de retirada de medicamentos do mercado, este estudo propõe a utilização de cardiomiócitos humanos produzidos a partir de células-tronco pluripotentes induzidas para estabelecimento de testes *in vitro* mais preditivos e avaliação da atividade anti-*T.cruzi* utilizando análises multiparamétricas em plataforma de *High Content Screening*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma doença negligenciada e endêmica em vários países latino-americanos. Mais recentemente, tornou-se também uma importante preocupação de saúde pública em regiões não-endêmicas da América do Norte e Europa, devido a processos migratórios (WHO, 2015). Aproximadamente, sete milhões de casos estão relatados em todo o mundo, e mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de infecção, tendo um impacto econômico e social significativo em regiões endêmicas (FLORES-CHAVEZ et al., 2018).

A principal causa da morbidade e mortalidade na doença de Chagas é associada ao acometimento cardíaco, que afeta cerca de 30% dos indivíduos infectados, durante a fase crônica. A fisiopatologia envolve uma resposta inflamatória difusa que leva à destruição progressiva do tecido cardíaco e substituição por áreas de fibrose (BOCCHI *et al.*, 2009). Na forma cardíaca, os pacientes podem apresentar miocardiopatia dilatada, hipertrofia, fibrose cardíaca e arritmias, com aumento do risco de eventos tromboembólicos, acidente vascular cerebral e morte súbita, sendo ainda uma das principais causas de insuficiência cardíaca na América Latina (ELLERT- *et al.*; LEE *et al.*, 2013).

2.1.1 Ciclo biológico e modos de transmissão do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, caracterizada pela existência de um flagelo único e do cinetoplasto, estrutura que contém o DNA mitocondrial (kDNA). Os vetores da doença de Chagas compreendem mais de 150 espécies de triatomíneos hematófagos, principalmente dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Em 1908, Carlos Chagas identificou barbeiros infectados por uma nova espécie de parasito tripanosomatídeo, inicialmente denominado de *Schiotrypanum cruzi* e, posteriormente, de *Trypanosoma cruzi*. Esse protozoário também foi observado em animais domésticos e em seres humanos (CHAGAS, 1909). Nas últimas décadas, devido às mudanças oriundas da expansão agrícola e agropecuária, bem como a expansão e criação de cidades, invadindo

territórios silvestres, os insetos se adaptaram ao ambiente doméstico na procura de novas fontes alimentares, tais como sangue de animais domésticos e de seres humanos (ZINGALES, 2011).

O modo de transmissão do *T. cruzi* descrito classicamente ocorre por via vetorial. O ciclo de vida do parasito começa quando o vetor triatomíneo ingere tripomastigotas através do repasto sanguíneo de um hospedeiro mamífero infectado. No intestino médio do vetor, os tripomastigotas se transformam em epimastigotas, o estágio de replicação em invertebrados. Os epimastigotas migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, que são excretados junto com as fezes do vetor. Os tripomastigotas metacíclicos entram através da ferida ocasionada pela picada ou através de uma mucosa lesionada do hospedeiro mamífero, invadindo vários tipos de células nucleadas. No citoplasma, os tripomastigotas se diferenciam na forma amastigota intracelular, que se replica com um tempo de duplicação de aproximadamente 12 horas durante um período de 4 a 5 dias. No final deste período, os amastigotas se transformam em tripomastigotas, que são liberados para a circulação através de rupturas na membrana celular. Os parasitas circulantes podem então invadir novas células e iniciar novos ciclos replicativos, além de estarem disponíveis para infectar vetores que se alimentam do sangue do hospedeiro (BERN, 2011; LONGO; BERN, 2015) (Figura 1).

Além da via vetorial, a transmissão da doença de Chagas em humanos pode ocorrer pelas vias oral e congênita, por transfusão de sangue e, de forma menos frequente, por acidentes de laboratório e transplante de órgãos. Atualmente, a via oral é a principal forma de transmissão do *T. cruzi* no Brasil (COURA; JUNQUEIRA, 2015).

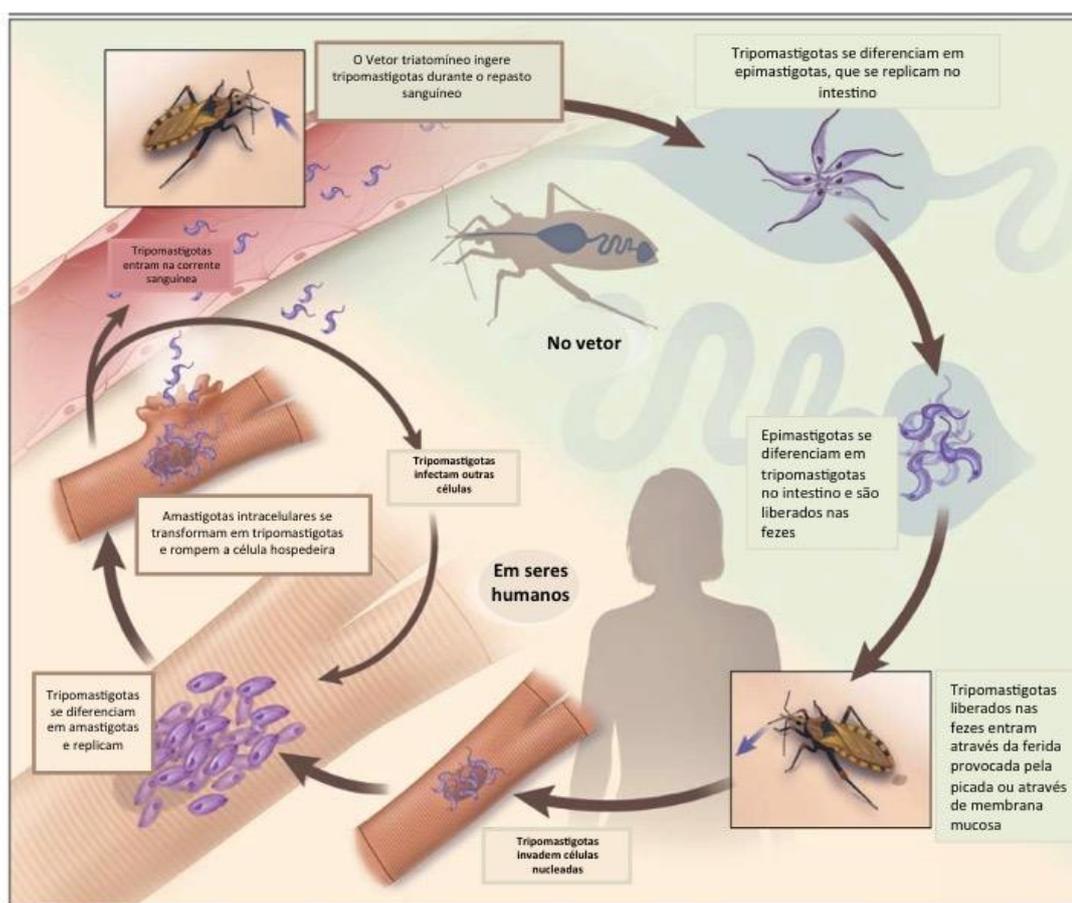


Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*, o agente causal da doença de Chagas. Fonte: (BERN, 2011, Adaptado)

2.1.2 Apresentação clínica

A infecção por *T. cruzi* apresenta duas fases, com apresentações clínicas bem distintas: aguda e crônica. O período de incubação após exposição ao *T. cruzi* transmitido por vetor é de cerca de uma a duas semanas. A fase aguda da infecção é caracterizada por replicação ativa do parasita e parasitemia detectável no esfregaço. A grande maioria das infecções agudas, no entanto, não são detectadas, devido à inespecificidade dos sinais e sintomas, que incluem febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em casos raros, observa-se sinais clínicos associados à porta de entrada e inoculação do parasito, como nódulos na pele (chagoma de inoculação) e edema palpebral prolongado indolor (sinal de Romana). A fase aguda pode resultar em complicações graves e potencialmente fatais, como a

meningoencefalite ou miocardite, em até 1% dos casos (BOCCHI *et al.*, 2009; CHAGAS, 1909; LONGO; BERN, 2015).

De quatro a oito semanas após o início da fase aguda, a replicação do parasito é controlada pela resposta imune do hospedeiro e a parasitemia diminui para níveis que não são detectáveis à microscopia, o que se associa à remissão dos sintomas. Contudo, a forma intracelular amastigota permanece nos tecidos infectados, especialmente no músculo cardíaco e esquelético. Após as oito primeiras semanas da infecção, estabelece-se a fase crônica da infecção e os indivíduos se apresentam em geral assintomáticos por um período de 10 a 15 anos ou mais, na chamada forma indeterminada da doença de Chagas. Estima-se que, em cerca de 20 a 30% dos indivíduos infectados ocorre a progressão, ao longo de anos, para a forma cardíaca, digestiva ou mista (BERN, 2011). A forma cardíaca é caracterizada por miocardite crônica associada a disfunção cardíaca e/ou arritmias e distúrbios de condução. A forma digestiva é caracterizada pela presença de megaesôfago e megacólon. A forma mista é caracterizada pela presença de acometimento simultâneo do coração e aparelho digestório (COURA; JUNQUEIRA, 2015). Surto de infecção por *T. cruzi* provocados por transmissão por via oral, através do consumo de alimentos ou bebidas contaminadas com fezes do vetor, foram associados a uma maior incidência de miocardite e maior taxa de mortalidade em comparação com casos de transmissão vetorial (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

2.1.3 Tratamentos disponíveis

O arsenal terapêutico atualmente disponível para a doença de Chagas é limitado e nenhuma nova droga foi introduzida no mercado nos últimos 40 anos (URBINA, 2015). As opções terapêuticas disponíveis são o benzonidazol, um derivado 2-nitroimidazólico, e nifurtimox, um derivado 5-nitrofurano, ambos fazendo parte da família dos compostos nitro-heterocíclicos. Ambos os medicamentos são pró-fármacos e requerem ativação a partir da enzima nitroreductase I do tripanosoma, e são eficazes apenas na fase aguda da doença (BERN, 2011; HALL; WILKINSON, 2012). No Brasil, está autorizada a comercialização do benzonidazol apenas.

O uso do nifurtimox ou benzonidazol está associado a diversos efeitos colaterais, incluindo erupções cutâneas, náuseas e insuficiência renal e hepática, que

podem se manifestar em aproximadamente 40% dos pacientes (CLAYTON, 2010). O benzonidazol tem sido considerado a droga de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas, já que o nifurtimox tem se mostrado mais tóxico, apresentando efeitos adversos neurológicos graves, como polineurite, convulsões e alterações psiquiátricas (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Esses efeitos adversos muitas vezes levam a uma fraca adesão ao tratamento e são responsáveis por deixar milhões de pessoas sem tratamento adequado. Portanto, existe uma necessidade urgente de medicamentos novos, seguros e eficazes para o tratamento da doença de Chagas (BAHIA, 2014; PAULI, 2017).

2.2 MODELO DE ESTUDO DE INFECÇÃO POR *T. CRUZI*

Para o desenvolvimento de novas drogas e estudos de patogênese da infecção, modelos *in vitro* e *in vivo* vêm sendo amplamente utilizados. Os tripomastigotas são capazes de parasitar diferentes tipos celulares, como fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, fibroblastos, macrófagos e células gliais (ANDRADE *et al.*, 2010). A aplicação de cultura de células *in vitro* atinge vários campos de interesse, tais como na investigação dos mecanismos de reconhecimento e invasão celular utilizados pelo parasita, mecanismos de resistência ou susceptibilidade a agentes quimioterápicos (MELLO, 1980). Dentre os modelos animais, a espécie mais utilizada é a de camundongos (*Mus musculus*), nos quais é feita a inoculação do parasito e, depois de algumas semanas, podem ser encontradas formas tripomastigotas na circulação periférica, com acometimento cardíaco progressivo (ROMANHA *et al.*, 2010).

A interação *T. cruzi*-célula hospedeira tem sido estudada em três sistemas principais: a) macrófagos e demais células fagocíticas, hematológicas; b) diferentes linhagens celulares imortalizadas; c) células musculares de cultivo primário (esqueléticas e cardíacas) ou diferenciadas a partir de linhagens de mioblastos. Modelos de infecção cardíaca *in vitro* tem sido empregada a partir de cardiomiócitos isolados de coração de camundongos, cultivados e infectados com o *T. cruzi*. (ANDRADE *et al.*, 2010; HANNA; HUBEL, 2009).

A interação entre o parasita e células hospedeiras é essencial para o *T. cruzi* se adaptar aos diferentes microambientes do seu ciclo de vida. No hospedeiro

mamífero, a infecção é conduzida por eventos de adesão e internalização envolvendo uma grande variedade de ligantes e receptores na superfície, tanto do parasita como da célula hospedeira. Várias moléculas de superfície no cardiomiócito estão envolvidas na adesão e internalização do parasita. Os resíduos de carboidratos de glicoconjugados de membrana em cardiomiócitos, incluindo resíduos de galactose, manose e ácido siálico, participam da aderência do *T. cruzi* (BARBOSA, 1993; CALVET *et al.*, 2012), enquanto que os receptores de manose na superfície dos cardiomiócitos modulam a entrada do parasita e são regulados negativamente pela infecção por *T. cruzi* (CALVET *et al.*, 2012; SOEIRO, 1999). A fibronectina, uma glicoproteína de alto peso molecular presente na superfície da célula hospedeira, é reconhecida pelos receptores de fibronectina do parasita, que interagem com a sequência RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) da fibronectina e medeiam a entrada de parasitas (CALVET *et al.*, 2004). O colesterol também é capaz de modular a invasão de cardiomiócitos por *T. cruzi* (DUARTE *et al.*, 2012), já que a remoção do colesterol da membrana celular cardíaca induziu uma redução de 85-90% da invasão parasitária ao inibir a associação dos parasitas com os lisossomos. Além disso, o receptor de lipoproteínas de baixa densidade, que é regulado no miocárdio de camundongos infectados, também coordena a entrada de parasitas e a fusão do vacúolo parasitóforo (PV) com os lisossomos (NAGAJYOTHI *et al.*, 2011).

Ao menos cinco modelos de invasão de células de mamífero por *T. cruzi* já foram descritos: (i) um mecanismo dependente de actina, levando ao rearranjo de microfilamentos, induzindo a membrana celular hospedeira a fagocitar o parasita (CALVET *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2006; MANQUE *et al.*, 2011); (ii) mecanismos dependentes do lisossomo, envolvendo um aumento dos níveis citosólicos transitórios de Ca^{2+} , induzidos pelo parasita, gerando despolimerização da actina cortical e recrutamento de lisossomos para o local de ligação ao parasita (DUARTE *et al.*, 2012); (iii) as vias de sinalização ativadas, incluindo receptores de tirosina cinase (TrKA e TrKC) (WEINKAUF *et al.*, 2011) e fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) (CALVET *et al.*, 2012) receptores de bradicinina (TODOROV *et al.*, 2002) e fator de transformação do crescimento β (TGF- β); (iv) reparo da membrana plasmática com o uso de esfingomielinas (FERNANDES; ANDREWS, 2012) e (v) via de autofagia da célula hospedeira (CALVET *et al.*, 2012).

Durante a interação do *T. cruzi*-cardiomiócitos, é observada uma protrusão de membrana plasmática de cardiomiócitos, orquestrada pelo rearranjo de citoesqueleto. Uma projeção densa de filamentos actina, do citoesqueleto de membrana, projeta-se do sarcolema e fagocita o parasita. Este evento foi drasticamente inibido (75%) quando as células cardíacas foram tratadas com citocalasina D, um agente que despolimeriza os filamentos de actina, antes da infecção pelo *T. cruzi* (MANQUE *et al.*, 2011). Uma vez dentro do cardiomiócito, o parasita está envolto em um vacúolo parasitário. A acidificação do vacúolo por fusão lipossômica leva à ativação de proteína formadora de poros transmembrânicos (Tc-Tox) e à ruptura da membrana do vacúolo parasitário, sendo este um pré-requisito para o tripomastigota sair do fagossoma, também permitindo que o parasita seja mantido intracelularmente e complete seu ciclo de vida (CALVET *et al.*, 2012).

A infecção por *T. cruzi* em cardiomiócitos está associada ao aumento da produção de quimiocinas, incluindo RANTES e proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP2), e de citocinas, tais como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que desencadeiam uma potente atividade tripanocida dependente da produção de óxido nítrico (MACHADO *et al.*, 2000). Como parte desta resposta, os cardiomiócitos infectados produzem interleucina-1 β (IL-1 β), que foi relatada como associada ao efeito hipertrófico observado nessas células (PETERSEN; BURLEIGH, 2003).

2.3 TRIAGEM DE DROGAS ANTI-*T. cruzi*

Diferentes estratégias têm sido amplamente utilizadas para a descoberta de novos tratamentos para Chagas, incluindo: i) reposicionamento de medicamentos atuais; ii) introdução de terapia combinada; e iii) identificação de novos alvos para quimioterapia (BAHIA, 2014). Atualmente, um candidato de droga desejado para doença de Chagas deve incluir: (i) alta atividade contra as formas parasitas presentes nos hospedeiros de mamíferos e contra diferentes *T. cruzi*, (ii) eficácia contra infecções agudas e crônicas, (iii) administração oral em baixas doses, (iv) baixa toxicidade e adequado perfil de segurança (incluindo comprovação de segurança em crianças e mulheres em idade reprodutiva), (v) baixo custo e alta estabilidade para

uma longa vida útil em temperaturas tropicais, e (vi) altos níveis de acumulação em tecido e longo prazo de meia-vida (SOEIRO; CASTRO, 2011). Além disso, é desejado o desenvolvimento de uma formulação capaz de levar a um aumento seletivo do fármaco nos locais parasitados, permitindo que o medicamento passe por barreiras biológicas (BAHIA, 2014; RODRÍGUES-POVEDA *et al.*, 2012). Uma das abordagens que têm sido utilizadas consiste na realização de análises bioquímicas e fisiológicas comparativas entre o parasito e o hospedeiro, buscando identificar alvos específicos em vias metabólicas chave para o parasito, mostrando ser uma interessante abordagem na busca de novas opções terapêuticas para doenças parasitárias (SOEIRO; CASTRO, 2011; SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002).

O consenso sobre a metodologia de triagem de drogas anti-*T. cruzi* está sumarizado na Figura 2 (ROMANHA *et al.*, 2010). As avaliações *in vitro* são realizadas em duas etapas, sendo que, na primeira etapa, os compostos devem ser testados a uma mesma concentração, o que permite avaliação concomitante dos efeitos em amastigotas e tripomastigotas. As triagens são então realizadas em células de linhagens imortalizadas, tais como Vero, HeLa, L929 e L6, utilizando nos experimentos a proporção parasita/célula hospedeira que leve a infecção de 50% das células. Aqueles compostos que apresentam efeitos tripanocidas similares ou maiores que os do benzonidazol, droga de referência, são testados na segunda fase. Nesta fase, é realizada avaliação de dose-resposta e determinação da EC₅₀, a concentração do composto que elimina 50% dos parasitos. Também nesta etapa deve ser avaliada a toxicidade às células de mamíferos

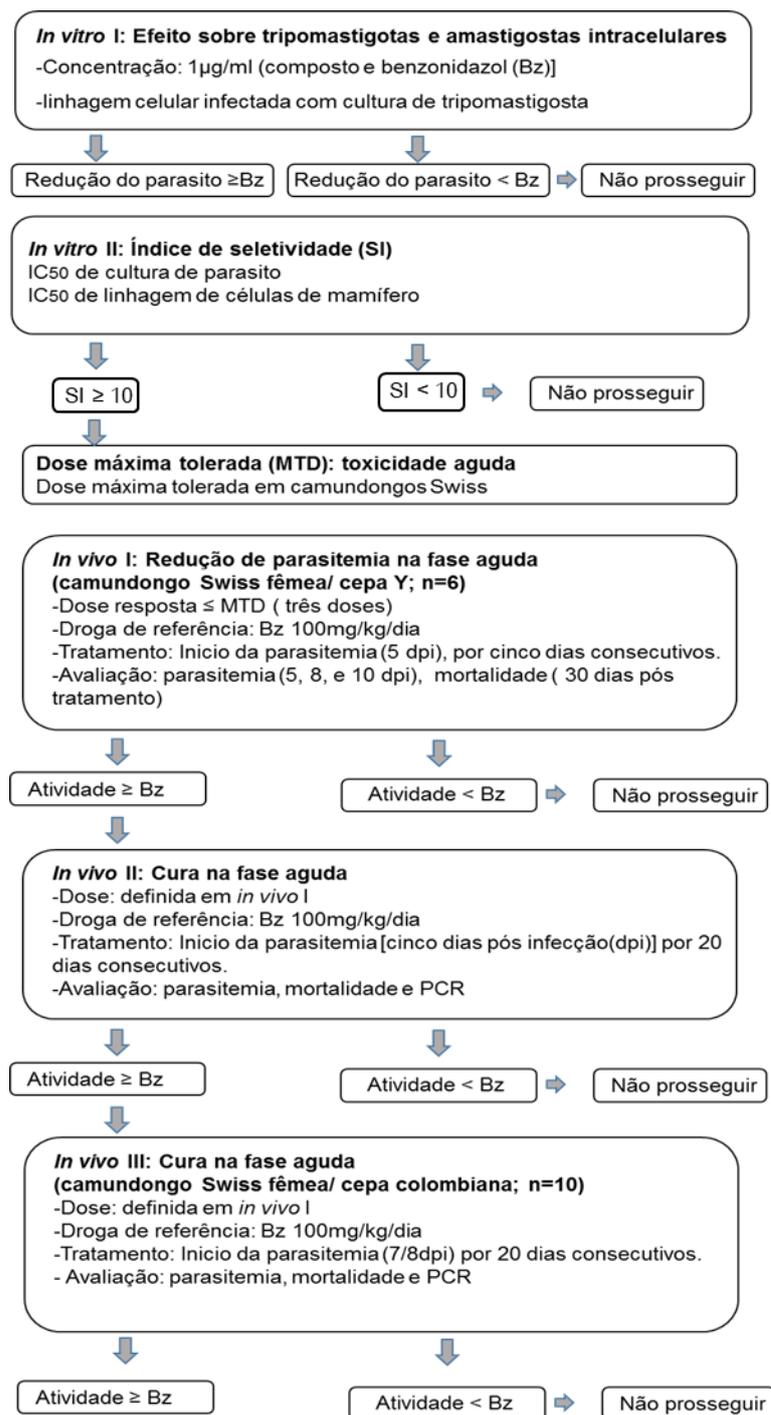


Figura 2: Gráfico de fluxo projetado como um protocolo geral e padronizado para testes de drogas aplicado à quimioterapia para a doença de Chagas. Fonte: (ROMANHA et al., 2010, Adaptado).

2.3.1 Caracterização bioquímica do *T. cruzi* e compostos com ação tripanocida

Através do sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, foi observada a presença de genes que expressam proteínas e estas, por sua vez, são potenciais alvos moleculares de fármacos (EL-SAYED et al., 2005). Dentre elas, as cisteíno-peptidases (CPs), serino-peptidases (SPs), metalo-peptidases (MPs), aspártico-peptidases (APs) e o proteassoma. O genoma do *T. cruzi* possui uma família de vinte genes que expressam cisteína proteases. Dessas, três cisteína proteases do *T. cruzi* foram caracterizadas bioquimicamente: cruzaina (gp57/51), catepsina B (TccatB) e autofagina-4 (TcAtg4) (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Destas, a melhor caracterizada é a cruzaina, que é expressa nos quatro principais estágios do parasita e está presente nas organelas ligadas ao lisossomo (SOARES; SOUTO-PADRIN; SOUZA, 1992). Além disso, há pequenas isoformas associadas à membrana plasmática, especificamente nos amastigotas. Algumas isoformas são secretado para o meio pelos tripomastigotas, e isso é altamente relevante para o papel da cruzaina como fator de virulência em Doença de Chagas, pois conferem ao parasita uma incrível habilidade de invadir células do hospedeiro (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). A cruzaina é expressa principalmente em tripomastigotas e amastigotas, tornando-se, assim, um alvo promissor para agentes tripanocidas.

As tiossemicarbazonas (Figura 3) são inibidores potentes da cruzaina e têm sido largamente estudadas como agentes tripanocidas. Devido à baixa drogabilidade das tiossemicarbazonas, foram feitas tentativas para identificar compostos, análogos estruturais, com efeitos antiparasitários melhorados (BEZERRA et al., 2015). Estudos demonstram que há ligação entre as tiossemicarbazonas e as tiazolidinonas (Figura 4), o que levou à identificação de tiazolidinonas como agentes antiparasitários (ZALDINI et al., 2010).

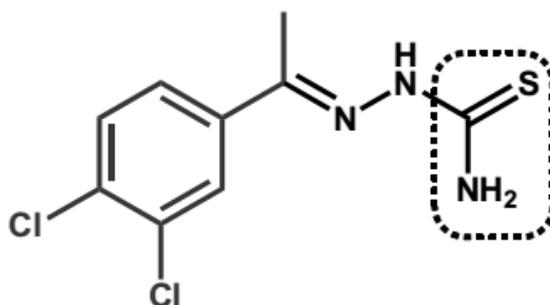


Figura 3: Estrutura química básica das tiossemicarbazonas (BEZERRA et al., 2015)

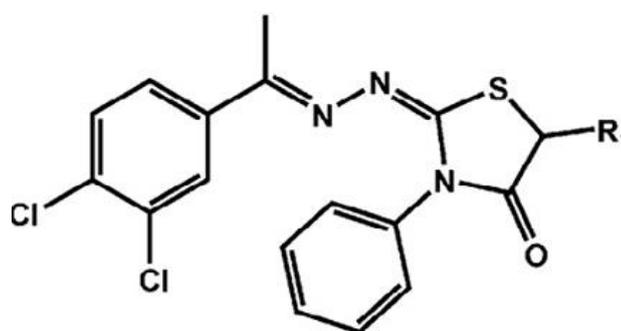


Figura 4: Estrutura química das tiazolidinonas (BEZERRA et al., 2015).

Foram selecionados dois derivados cíclicos das tiazolidinonas 2-[1-(3,4-diclorofenil) etilideno-hidrazona]-3-fenil-5-metiltiazolidin-4-ona (GT5A), e 2-[1-(3,4-diclorofenil) etilideno- hidrazona] -3-fenil-5-etiltiazolidin-4-ona (GT5B), diferenciados pelo grupo metil e etilo respectivamente, que demonstraram alta ação tripanocida e alto índice de seletividade (BEZERRA et al., 2015).

Outro composto que tem sido reportado pela literatura é o ácido betulínico. Este faz parte da classe dos terpenoides de ocorrência natural e representam uma classe importante de compostos bioativos que exibem várias propriedades medicinais (YIN, 2015). O ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico do tipo lupano abundante no reino vegetal, que pode ser isolado de várias espécies de plantas ou obtida através da betulina, seu precursor metabólico (YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005). O ácido betulínico e seus derivados exibem uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo atividade anti-HIV, antibacteriana, antimalárica, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antinociceptiva, anti-herpes simplex vírus-1 (HSV-1),

atividade imunomoduladora, antiangiogênica e atividade anticancerígena (LEE et al., 2015; SOUSA et al., 2017).

Em relação à atividade anti-*Trypanosoma*, trabalhos demonstram que o ácido betulínico e derivados de éster inibem a proliferação de epimastigotas e reduzem a viabilidade de tripomastigotas (DOM; PEN; GIM, 2010)(MEIRA et al., 2016). Deste modo, o ácido betulínico tem sido considerado um protótipo para o planejamento e síntese de agentes antiprotozoários (DOM; PEN; GIM, 2010; GROS et al., 2006).

Modificações químicas do grupo carboxila sugeriram que essa parte da molécula pode produzir derivados com atividade antiprotozoária aumentada quando comparada ao ácido betulínico (ADEMAR et al., 2011; GROS et al., 2006; SOUSA et al., 2014; SPIVAK et al., 2014). Nosso grupo investigou a contribuição da inserção de amina no C-28 do ácido betulínico para um aumento da atividade anti-*T. cruzi*. A inserção de um grupamento amina potencializou o efeito tripanocida de uma série de derivados sobre a viabilidade de formas tripomastigotas. Em especial, o composto BA5 que se mostrou menos citotóxico em culturas de macrófagos e mais efetivo na lise de formas tripomastigotas de *T. cruzi* do que o ácido betulínico (Figura 5) (MEIRA et al., 2016).



Figura 5: Esquema comparando a citotoxicidade e atividade anti-*T. cruzi* do ácido betulínico e seu derivado BA5. Imagem reproduzida de MEIRA, 2017 com permissão do autor.

2.4 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são células não-especializadas que possuem o potencial para dar origem a diferentes tipos celulares. Quando as células-tronco se dividem, elas mantêm um *pool* de células indiferenciadas, através de sua capacidade de autorrenovação e, ao mesmo tempo, geram células especializadas, contribuindo para regeneração de tecidos específicos, processo conhecido como divisão assimétrica (SURENDRAN; SIVAMURTHY, 2015). As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna de blastocistos, possuindo a capacidade para crescer indefinidamente, mantendo a pluripotência e a capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas (MARTIN, 1981; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006) Estas células estão sujeitas a questões éticas associada à utilização de embriões humanos como fonte, e à possibilidade de rejeição imunológica, por se tratar de uma fonte alogênica de células para transplante (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

A necessidade de superar estas barreiras levou ao surgimento de uma nova tecnologia, chamada de reprogramação celular. Através dessa tecnologia, é possível a geração de células pluripotentes a partir de células somáticas diferenciadas. Células-tronco pluripotentes humanas (hPSCs), incluindo células-tronco embrionárias (hESCs) e células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs), podem proliferar indefinidamente em um estado indiferenciado, além de serem capazes de diferenciar em vários tipos de células dos diferentes tecidos humanos (MINAMI *et al.*, 2012). As iPSCs se assemelham às células embrionárias encontradas nas fases iniciais do desenvolvimento dos embriões de mamíferos, e são indistinguíveis das hESCs quanto à morfologia, manutenção da pluripotência, proliferação e expressão gênica. Com estes resultados, provou-se que as hiPSCs podem ser geradas a partir de células somáticas por combinação de um pequeno número de fatores. Esta descoberta foi feita pela equipe liderada por Shinya Yamanaka, que demonstrou que as iPSCs podem ser geradas a partir de fibroblastos através da expressão forçada, mediada por transdução retroviral com quatro fatores de transcrição, denominados: OCT3/4, Sox2, c-Myc, e KLF4 (TAKAHASHI *et al.*, 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

2.5 APLICAÇÕES DAS iPSCs

As aplicações potenciais das iPSCs têm impacto na medicina regenerativa, indústria farmacêutica e biotecnologia. As iPSCs humanas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos tratamentos, seja através da modelagem de doenças, permitindo o estudo do início e progressão da doença *in vitro*, permitindo testes de drogas, ou ainda para aplicações em terapia celular, para o tratamento de muitas doenças degenerativas, tais como o diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doenças cardiovasculares. As hiPSCs são cada vez mais utilizadas no estudo de doenças cardíacas, inclusive na modelagem *in vitro* de doenças, triagem de cardiotoxicidade, descoberta de drogas e estudo do desenvolvimento cardíaco humano. Além disso, um dos objetivos almejados no campo de diferenciação cardíaca é fornecer células para uso em terapia celular (BURRIDGE *et al.*, 2014).

A insuficiência cardíaca e doenças cardiovasculares são doenças devastadoras e permanecem como parte das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (KADARI *et al.*, 2015). Frequentemente, após o infarto do miocárdio, ocorre uma perda maciça de cardiomiócitos que, por mecanismos endógenos não são regenerados ou substituídos de modo eficaz (BURRIDGE *et al.*, 2012). Assim, para criar terapias regenerativas mais eficazes, deve-se encontrar um tipo celular que pode ser extensivamente expandido *in vitro* e robustamente diferenciado em células cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2016). A diferenciação direta e específica de hPSCs é o primeiro passo crítico para a construção de modelos de desenvolvimento ou doença, ferramentas de triagem de drogas ou terapias celulares de hPSCs. Como os cardiomiócitos pós-natais têm pouca ou nenhuma capacidade regenerativa, as hiPSCs podem ser uma fonte para suprimento ilimitado de cardiomiócitos de uma única fonte clonal (LIAN *et al.*, 2013).

2.6 DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA

Três famílias de fatores de crescimento são usadas para controlar estas fases iniciais de formação de mesoderme e cardiogênese: proteínas de morfogênese óssea (BMPs), que são membros da superfamília do fator de crescimento e transformação

(TGF); as proteínas *wingless/INT* (WNTs), e os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) (OLSON; SCHNEIDER, 2003). Das vias de sinalização envolvidas no processo, a modulação da via Wnt tem tido destaque pela alta influência na especialização cardíaca. A ação da Wnt é complexa, porém pode inibir ou promover a diferenciação pela via de sinalização canônica, agindo através de via β -catenina/GSK3 para reprimir a cardiogênese ou a via não-canônica, que atua através da proteína JNK para promover cardiogênese (COHEN *et al.* 2008; NAITO *et al.*, 2006; OLSON; SCHNEIDER, 2003).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina regula uma variedade de processos celulares durante o desenvolvimento de invertebrados e vertebrados, incluindo a proliferação e a diferenciação celular (KARNER *et al.* 2006). Ligações de β -catenina ao citoesqueleto, na adesão célula-célula, atuam como moléculas de sinalização intracelular da via de ligações Wnt. A ativação desta via resulta em inativação de um complexo multiprotéico, o qual é composto de GSK-3, axina, e APC. Esta inativação conduz a uma diminuição da fosforilação da β -catenina, que, posteriormente, evita a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (WILLERT; JONES, 2006). Como consequência, a β -catenina se acumula no citoplasma e é translocada para o núcleo, que conduz à ativação da transcrição de um grande número de genes-alvo que controlam diversos processos celulares e teciduais. Na ausência da ativação da via Wnt, a β -catenina é fosforilada e degradada através do sistema ubiquitina-proteassoma (LLUIS *et al.*, 2008).

2.6.1 Aplicação de Cardiomiócitos Derivados de iPSC em Modelos *In Vitro* de Doenças

Nos últimos anos, o potencial completo da tecnologia iPSC para criar modelos de doenças de pacientes com defeitos genéticos começou a ser explorado (NARSINH *et al.*, 2011; SAHA; JAENISCH, 2009). As células obtidas de pacientes com doenças genéticas possuem os mesmos determinantes genéticos da doença do paciente e podem ser utilizadas para recapitular *in vitro* diferentes aspectos da doença. O número de doenças modeladas com êxito através de iPSCs também está aumentando constantemente, refletindo a sua crescente utilidade e versatilidade como plataformas

para estudar desenvolvimento e modelos de doenças *in vitro*, bem como investigar fisiopatologia e testar agentes terapêuticos (EBERT *et al.*, 2009; HARTMAN *et al.*, 2016)(ITZHAKI *et al.*, 2011) (Figure 6).

A utilização de células humanas em modelos experimentais possui vantagens em relação ao uso de modelos em animais. Modelos em animais nem sempre demonstram os mesmos fenótipos que os observados em seres humanos. Por exemplo, os camundongos apresentam uma frequência cardíaca muito maior que os seres humanos (em torno de 600 batimentos por minuto), além de potenciais de ação muito mais curtos, em decorrência de diferenças espécie-específicas nos tipos e / ou distribuição dos canais de íons cardíacos. A análise *in vitro* de cardiomiócitos humanos é, portanto, importante para entender o mecanismo das arritmias genéticas humanas, e os iPSCs podem preencher essa lacuna de conhecimento em relação a alterações genéticas no contexto celular "nativo" (A. EBERT, P. LIANG, 2012). Outra realidade da aplicação dos cardiomiócitos derivados de iPSCs é o desenvolvimento de fármacos, bem como no teste de toxicidade de drogas. Estes cardiomiócitos tornam-se um sistema de modelo *in vitro* particularmente atraente devido ao seu uso para avaliação da função cardíaca, uma característica desafiadora de ser modelada mesmo em animais, outra vantagem importante de tal ensaios fenotípicos é que é possível avaliar o efeito de drogas que não interaja com moléculas alvo conhecidas (GRIMM *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2011).

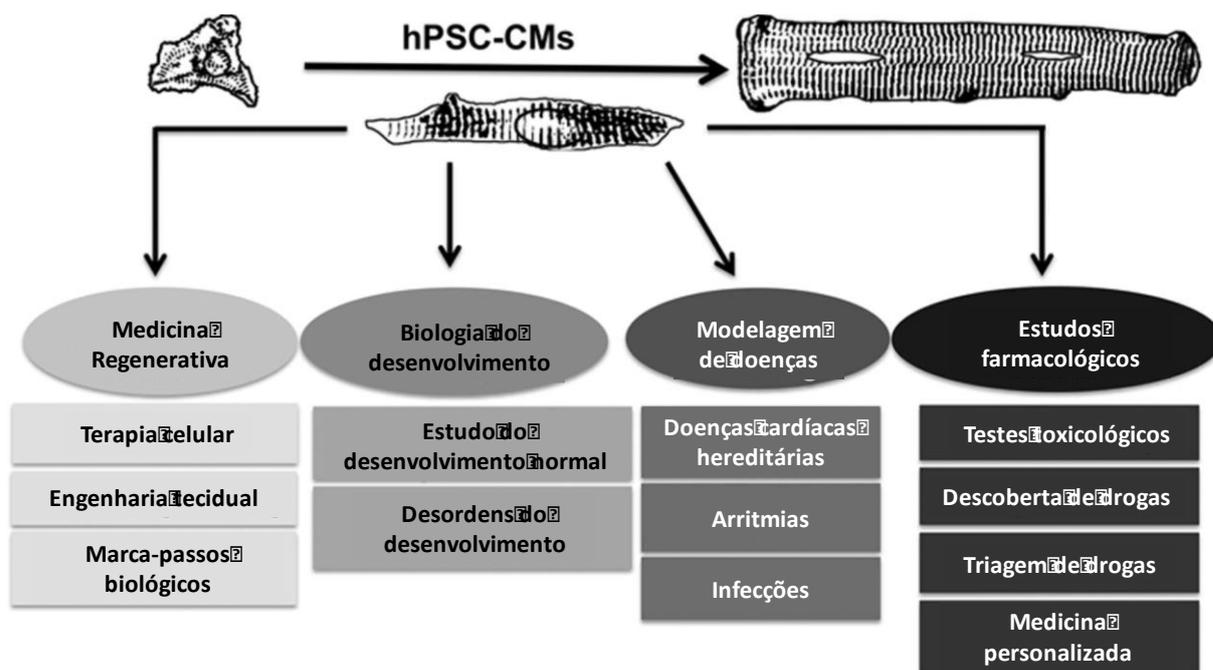


Figura 6: Possíveis aplicações de cardiomiócitos derivados de iPSCs. O esquema demonstra aplicações de iPSC-CM em medicina regenerativa, estudos de biologia do desenvolvimento, modelagem de doenças e estudos farmacológicos (adaptado de YANG; PABON; MURRY, 2014).

Existem pelo menos três áreas em que os cardiomiócitos derivados de iPSC podem trazer contribuições importantes para o campo de farmacologia e toxicologia. Uma área é a identificação de novos alvos de drogas. As iPSCs de pacientes com doenças de causas genéticas podem ser usadas como fonte de cardiomiócitos específicos do paciente. Estudos *in vitro* com estes cardiomiócitos podem levar à identificação de moléculas envolvidas na fisiopatologia das doenças que representam possíveis novos alvos de drogas. Uma segunda área na qual estes cardiomiócitos podem avançar no contexto farmacológico é o uso dessas células em ensaios fenotípicos para triar bibliotecas de compostos para efeitos cardiovasculares benéficos. A terceira área é a farmacologia de segurança, crucial para a triagem de drogas candidatas para cardiotoxicidade (SINNECKER *et al.*, 2014). Os ensaios fenotípicos baseados em cardiomiócitos derivados de iPSC são uma grande promessa de complementar ou substituir os ensaios atualmente usados, baseados em cardiomiócitos primários de animais de laboratório ou em linhagens celulares superexpressando ou inibindo canais iônicos.

A cardiotoxicidade induzida por drogas pode se manifestar como morte celular de cardiomiócitos ou através de alterações subletais. As anormalidades relacionadas à morte, como a alteração e fragmentação da forma nuclear, a degradação do DNA,

a ativação da caspase, a permeabilização da membrana externa mitocondrial e o desprendimento celular são formas de avaliação de morte e efeito citotóxico em cardiomiócitos (MIOULANE *et al.*, 2012). Este tipo de abordagem tem a possibilidade de obter perfis de cardiotoxicidade específicos de candidatos de drogas *in vitro*, que podem ser comparados com aqueles de substâncias com potencial cardiotoxígeno comprovado, como a doxorrubicina (BLAU *et al.*, 2016; SINNECKER *et al.*, 2014).

Em um estudo de ensaio de cardiotoxicidade, avaliou-se a toxicidade da doxorrubicina em cardiomiócitos derivados de hiPSCs. A doxorrubicina é um agente de quimioterapia com antraciclina, eficaz no tratamento de doenças malignas com um efeito colateral cardiotoxígeno dose-resposta bem estabelecido que pode levar à insuficiência cardíaca. Atualmente, não é possível prever quais pacientes serão afetados pela cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina (DIC) (LIPSHULTZ *et al.*, 2015). Um estudo demonstrou que os cardiomiócitos derivados de hiPSC paciente específicos podem recapitular as individuais predisposições de pacientes ao DIC. Os dados obtidos indicam que o uso de hiPSC-CMs representa uma plataforma adequada para identificar e verificar a base genética e os mecanismos moleculares da DIC (BURRIDGE *et al.*, 2016).

Uma aplicação dos cardiomiócitos derivados de iPSCs é a utilização para modelagem de doenças *in vitro* de arritmias cardíacas. Um exemplo proeminente de arritmia cardíaca é a síndrome do QT longo (LQTS) (ITZHAKI *et al.*, 2011) (HORIE, 2012), que é uma síndrome arritmogênica, comumente herdada de parentes de primeiros grau, caracterizada por função de canal iônico anormal e morte súbita cardíaca (GOLDENBERG; MOSS; YORK, 2008). No estudo realizado por Itzhaki e colaboradores, foram produzidos cardiomiócitos derivados de iPSC humanas específicas de paciente com a síndrome LQTS, com a finalidade de recapitular o fenótipo da doença *in vitro*, fornecendo informações importantes e oferecendo uma plataforma para avaliar agravantes e terapias paciente-específicas. Os cardiomiócitos gerados das iPSCs de pacientes com a LQTS mimetizaram o genótipo e fenótipo funcional anormal da doença. Em seguida, estas células foram utilizadas para avaliar a potência de agentes farmacológicos, existentes e novos, que funcionam como bloqueadores dos canais iônicos, permitindo a identificação de potenciais novos agentes terapêuticos. Essa tecnologia, portanto, mostrou-se promissora para estudar

mecanismos de doenças, otimizar o atendimento ao paciente (medicina personalizada) e auxiliar no desenvolvimento de novas terapias (ITZHAKI *et al.*, 2011).

Outro modelo de estudo que utiliza cardiomiócitos derivados de iPSCs é a cardiomiopatia hipertrófica (CMH). Trata-se de uma doença genética autossômica dominante em que uma parte do miocárdio é fortemente hipertrofiada. É causada por mais de 1400 mutações em pelo menos 11 genes que codificam miofilamentos contráteis espessos e finos do sarcômero ou do disco Z adjacente (MARON; MARON, 2012). Os pacientes com CMH exibem um espessamento anormal do ventrículo esquerdo na ausência de aumento da carga hemodinâmica. A maioria das pessoas com CMH hereditário está livre de sintomas ou tem apenas sintomas leves, mas o risco de complicações clínicas como insuficiência cardíaca progressiva, arritmia e morte cardíaca súbita é fortemente aumentado (LAN *et al.*, 2014). Os esforços para elucidar os mecanismos de desenvolvimento do CMH levaram à geração de hiPSC-CMs específicos do paciente que recapitularam *in vitro* uma série de características da doença, incluindo a hipertrofia celular e a arritmia contrátil. No estudo, as hiPSCs foram gerados a partir de uma coorte familiar que carregava uma mutação hereditária CMH (Arg663His) no gene MYH7 e posterior diferenciação em cardiomiócitos. Os cardiomiócitos gerados exibiram o genótipo e fenótipo funcional anormal da doença. Utilizando este modelo, os autores mostraram que os transitórios níveis irregulares de Ca^{2+} e a elevação do cálcio intracelular diastólico $[Ca^{2+}]_i$ precedem a apresentação de outras anormalidades fenotípicas, implicando fortemente a desregulação do ciclo Ca^{2+} na patogênese da doença. O rastreamento de fármacos em hiPSC-CMs doença-específica apoiou ainda mais a descoberta da elevação do cálcio intracelular diastólico $[Ca^{2+}]_i$ como o mecanismo central para o desenvolvimento da arritmia, levando ao tratamento da doença apenas com fármacos bloqueadores de Ca^{2+} e Na^+ (LAN *et al.*, 2014).

No estudo de Drawnel e colaboradores, foram feitos modelos *in vitro* para estudar a cardiomiopatia diabética. Diabetes provoca remodelamento patológica do músculo cardíaco, o que prejudica a função cardíaca. Esta enfermidade se dá por complicação do diabetes tipo 2, que pode ser adquirido por estilo de vida e fatores genéticos. A cardiopatia diabética é uma condição multifatorial complexa que se distingue por um conjunto único de mudanças metabólicas, estruturais e moleculares

no cardiomiócito diabético (MANDAVIA et al., 2012). Foi desenvolvido um modelo *in vitro* de cardiomiócitos derivados de iPSC humanas, que mimetizou a cardiopatia diabética usando de fatores risco que induzem a diabete e fatores genéticos. Primeiro, mimetizaram a química clínica diabética para induzir um fenotípico da cardiomiopatia diabética, que causaram alterações estruturais e funcionais nos cardiomiócitos. Em seguida, observaram os efeitos genéticos através da obtenção de cardiomiócitos de dois pacientes diabéticos. O fenótipo é reproduzido nas células específicas dos pacientes, com gravidade dependente de seu estado clínico original. Esses modelos foram incorporados em níveis sucessivos de uma plataforma de triagem, identificando medicamentos que preservam o fenótipo de cardiomiócitos *in vitro* durante o estresse diabético. Neste trabalho, foi apresentado um modelo de cardiomiócitos derivados de iPSC de uma condição metabólica complexa, mostrando o poder dessa técnica para a descoberta e teste de estratégias terapêuticas para uma doença com significância clínica (DRAWNEL et al., 2014).

Mais recentemente, doenças infecciosas também passaram a ser estudadas através de modelos *in vitro* de infecção utilizando cardiomiócitos derivados de iPSC, como o a miocardite viral. A miocardite é caracterizada por inflamação miocárdica que pode evoluir para cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca, e são causados por infecções bacterianas e virais (COOPER, 2009). No estudo, foi demonstrado que os hiPSC-CMs são suscetíveis à infecção por vírus coxsackie B e podem ser usados para prever a eficácia de medicamentos antivirais (SHARMA, 2014).

A infecção com *T. cruzi* foi alvo recente de estudo utilizado hiPSC-CM. Os cardiomiócitos foram infectados com *T. cruzi* cepa Y e tratados com benzonidazol e foram avaliados a citotoxicidade e inibição da infecção. O valor de CC₅₀ obtidos nesse estudo foi CC₅₀ > 500 µM, demonstrando que o benzonidazol não teve efeito citotóxico mesmo em altas concentrações, tendo apresentado atividade anti-parasitária com EC₅₀ = 1.13 ± 0.2 µM. O estudo demonstrou a susceptibilidade dos hiPSC-CM à infecção parasitaria e a viabilidade dessa tecnologia para o estudo *in vitro* do modelo proposto (LARA et al., 2018).

2.7 MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES DE CARDIOTOXICIDADE

A cardiotoxicidade frequentemente está associada ao comprometimento da eletrofisiologia do coração. Entretanto, há drogas que não comprometem a eletrofisiologia do coração e também pode ser cardiotóxicas, por danificar diretamente os cardiomiócitos em nível subcelular e molecular, via estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS), danos no DNA, dano mitocondrial, apoptose ou perturbação de eventos de sinalização molecular (CHAUDHARI et al., 2016) (SALA, 2017). Alguns outros mecanismos sugeridos de cardiotoxicidade incluem, por exemplo, expressão gênica de várias proteínas cardíacas importantes, desregulação da degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma, desorganização do citoesqueleto ou interferência com TOP2 (LYU et al., 2007)(SISHI et al., 2012). Níveis elevados de troponina I cardíaca (cTnI) e troponina T cardíaca (cTnT) no sangue correlacionam-se bem com lesão miocárdica e atuam como biomarcadores plasmáticos críticos para o diagnóstico de dano cardíaco em estudos clínicos e pré-clínicos (BABUIN; JAFFE, 2005). No entanto, altos níveis desses biomarcadores ocorrem apenas após o dano cardíaco e podem ser detectados por apenas algumas horas após o infarto do miocárdio e o tratamento com drogas cardiotóxicas (CHAUDHARI et al., 2016).

Os cardiomiócitos utilizam uma enorme quantidade de adenosina trifosfato (ATP), estando em constante estado contrátil e de consumo de energia. Para manter a produção constante de ATP, as mitocôndrias com mau funcionamento são constantemente substituídas por organelas recém-sintetizadas por processos envolvendo biogênese e replicação mitocondriais e autofagia / mitofagia (VARGA et al., 2015a) (FISCHER; HAMANN; OSIEWACZ, 2012). Como as mitocôndrias são responsáveis pela produção de ATP, espera-se que agentes que interferem na função mitocondrial dos cardiomiócitos induzam a depleção do pool de ATP. Eventualmente, esses processos podem levar a disfunção miocárdica (VARGA et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um ensaio de infecção com *T. cruzi* em culturas de cardiomiócitos produzidos a partir de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CM) para triagem *in vitro* de drogas anti-*T. cruzi*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar cardiomiócitos a partir da diferenciação de hiPSC;
- Padronizar um ensaio de triagem de compostos com atividade tripanocida em hiPSC-CM;
- Estabelecer parâmetros para avaliação de toxicidade em hiPSC-CM;
- Avaliar a atividade anti-parasitária e cardiotoxicidade dos compostos derivados da tiazolidinonas e do ácido betulínico em hiPSC-CM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa (CEP) do Hospital São Rafael-Monte Tabor, em 22 de julho de 2013, sendo o parecer liberado em 10 de agosto de 2013, CAAE 20032313.6.0000.0048.

4.2 CULTIVO DE IPSC

As iPSCs foram obtidas previamente a partir da reprogramação de células mononucleares do sangue periférico utilizando vetores epissomais introduzidos na célula através da técnica de nucleofecção (Nucleofector 4D, Lonza, Basel, Suíça). Duas linhagens de iPSCs, obtidas de doadores diferentes, foram cultivadas em placas de cultura revestidas com Matrigel (Corning, Nova Iorque, EUA), em meio de manutenção de pluripotência, mTeSR™1 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) com a suplementação de mTeSR™1 5X *Supplement* (Stem Cell Technologies). O meio de cultura foi repostado diariamente e as células foram dissociadas com ReleSR (Stem Cell Technologies) quando atingida a confluência de 80%, sendo redistribuídas em uma razão de 1:4 e mantidas nesta razão. Estoques de células foram criopreservadas e mantidas em nitrogênio líquido.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS IPSC

4.3.1 Citometria de fluxo

Os poços foram lavados com 1 ml de PBS 1X, e incubados com solução de tripsina-EDTA (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA), a 37°C e 5% CO₂ por 5 minutos, e centrifugadas 350 g por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram contadas em câmara de Neubauer, foi realizada marcação utilizando anticorpo TRA1-60 conjugado com fluorocromo APC para as células pluripotentes e anti-troponina T cardíaca para os cardiomiócitos. (Tabela 1). Por se tratar de antígeno intracelular, foi realizada a permeabilização com PBS+Triton 0,3% (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Brasil), com secundário anti-mouse igG conjugado com Alexa Fluor 647 (Tabela 1). A aquisição dos dados foi feita no citômetro LSR FortessaSORP

(BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) utilizando o *software* de aquisição e análise FACS DIVA v.6.3.

4.3.2 Imunofluorescência

As iPSC foram cultivadas em placa de 24 poços, contendo lamínulas (Knittel). Atingida confluência de 50%, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EUA) durante 15 minutos. Em seguida foi feita a lavagem dos poços por duas vezes com PBS 1x durante 5 minutos e permeabilizou-se com Triton X-100 0,1% (Vetec Química Fina) por 10 minutos. Após a lavagem com PBS 1X por 5 minutos, realizou-se o bloqueio com *Cas-blocker* (ThermoFisher Scientific) 10 minutos seguido pela incubação a 4° C *overnight* com os anticorpos primários TRA 1-60, SOX2, OCT4, NANOG (Tabela 1). Após o período de incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 5 minutos, seguida de duas lavagens com PBS 1X por mais 5 minutos. Subsequentemente foi realizada a incubação em temperatura ambiente durante 1 hora com o anticorpo secundário (Tabela 1). Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% (Vetec Química Fina) durante 5 minutos e mais duas lavagens com PBS também por 5 minutos. As lamínulas foram montadas com meio de montagem VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories) para coloração nuclear, e analisadas utilizando microscópio confocal A1+ (Nikon, Tóquio, Japão).

Os cardiomiócitos foram cultivados em placa de 96 e 384 poços revestidas com Matrigel (Corning). Foi usado o marcador de mitocôndrias MitoTracker® (ThermoFisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Utilizou-se 250 nM de MitoTracker® por 30 minutos incubados a 37°C e 5% CO₂. Após esse período as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) durante 20 minutos. Em seguida, foi feita a lavagem dos poços por uma vez com PBS 1x durante 5 minutos e permeabilizou-se com Triton X-100 0,1% (Vetec Química Fina) por 10 minutos. Após a lavagem com PBS 1X por 5 minutos, realizou-se o *bloqueio com *Cas-block* (Thermo Fisher Scientific) 10 minutos, seguido pela incubação a 4° C *overnight* com o Troponina T. Após o período de incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 5 minutos, seguida de duas lavagens com PBS 1X por mais 5 minutos. Subsequentemente foi realizada

a incubação em temperatura ambiente durante 1 hora com o anticorpo secundário anti-mouse igG conjugado a Alexa Fluor 568 e Faloidina conjugado a Alexa Fluor 488. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% (Vetec Química Fina) durante 5 minutos e mais duas lavagens com PBS também por 5 minutos. Foi utilizado Draq 5 1:1000 ou Hoechst 33342 1:1000 (ThermoFisher Scientific) para coloração nuclear.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização por Citometria de fluxo e Imunofluorescência de hPSC e hPSC-CM.

Anticorpo	Marcação	Fabricante	Produzido	Catálogo	Diluição	Isotipo
TRA-1-60	-	Abcam	Camundongo	ab16288	1:500	IgM
Oct4	-	Abcam	Coelho	ab181557	1:500	IgG
Sox2	-	Santa Cruz Biotechnology	Cabra	sc-17320	1:100	IgG
Nanog	-	Abcam	Coelho	ab80892	1:200	IgG
Troponina T	-	Abcam	Camundongo	ab33589	1:200	IgG
Faloidina	AlexaFluor488	Thermo Fisher Scientific	-	a12379	1:100	-
anti-Camundongo	Alexa Fluor 647	Invitrogen	Cabra	a21236	1:1000	IgG
anti-Camundongo	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cabra	a-21042	1:1000	IgM
Anti-Camundongo 568	AlexaFluor568	Invitrogen	Asno	a10037	1:800	IgG
anti-Coelho	Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	Asno	a-11079	1:1000	IgG
anti-Cabra	Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	Coelho	a-11079	1:1000	IgG

4.4 PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO EM CARDIOMIÓCITOS

Para a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos, foi utilizado o kit de diferenciação comercial *PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit* (ThermoFisher Scientific). Este kit consiste em um conjunto de meios sem soro e livre de componentes derivados de animais que promovem a diferenciação eficiente de células-tronco pluripotentes humanas em cardiomiócitos contráteis em 8 dias. O kit é composto por três diferentes meios: meio de manutenção de cardiomiócitos (*Cardiomyocyte Maintenance Medium*) e meios de diferenciação de cardiomiócitos A e B (*Cardiomyocyte Differentiation Medium A and B*). O processo de diferenciação se deu seguindo as recomendações do fabricante. As células foram dissociadas com ReleSR (Stem Cell Technologies), de um poço da placa de seis poços, ao atingir a confluência de 70 à 85%, e redistribuídas em razão de 1:8 em placas de cultura de 12 poços revestidas com Matrigel (Corning), em meio de manutenção de pluripotência mTeSR™1 (Stem Cell Technologies) com a suplementação de mTeSR™1 5X *Supplement* (Stem Cell Technologies), e 10 µM de Y27632 (Rock Inhibitor- Stem Cell Technologies), incubados a 37°C 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído diariamente, durante três dias.

Após os três dias, deu-se início ao processo de diferenciação, período este denominado de Dia 0. O meio mTeSR foi substituído pelo meio comercial *Cardiomyocyte Differentiation Medium A*. No Dia 2, foi substituído o meio antigo pelo *Cardiomyocyte Differentiation Medium B*. No Dia 4, foi substituído o meio antigo pelo *Cardiomyocyte Maintenance Medium*. A cada dois dias foi renovado o meio com *Cardiomyocyte Maintenance Medium*. Contrações espontânea foram observadas a partir do dia 8 da diferenciação.

4.5 OPERETTA HIGH-CONTENT IMAGING SYSTEM

4.5.1 Padronização da análise de imagens no *Operetta High Content System*

Cardiomiócitos derivados de hiPSC (hiPSC-CM) foram cultivados em placas de 96 ou 384 poços na densidade de 2×10^4 células/poço e 7×10^3 células/poço, respectivamente, e infectadas conforme o protocolo estabelecido previamente. Após

48 horas de tratamento com os compostos, as células foram fixadas com PFA a 4% e marcadas com Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) ou DRAQ5 (eBioscience). As imagens foram adquiridas no *Operetta High Content System* (PerkinElmer) utilizando objetiva de 10X. As células tiveram a região nuclear (Figura 7A) e citoplasmática (Figura 7B) delimitadas pelo canal do Hoechst 33342 ou DRAQ5 (segmentação) utilizando o software *Harmony*. O formato e intensidade de fluorescência do núcleo e do citoplasma foram utilizados para contagem do número de células em cada poço. O citoplasma foi segmentado através do canal Alexa 594, correspondente à marcação com Troponina T. As amastigotas intracelulares foram detectadas como *spots* somente na região do citoplasma utilizando a fluorescência do DRAQ5 (Figura 7D). Um controle de células não infectadas foi utilizado para exclusão de *spots* citoplasmáticos que não sejam amastigotas (Figura 7C), utilizando parâmetros morfológicos e de intensidade de fluorescência para a seleção. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada grupo.

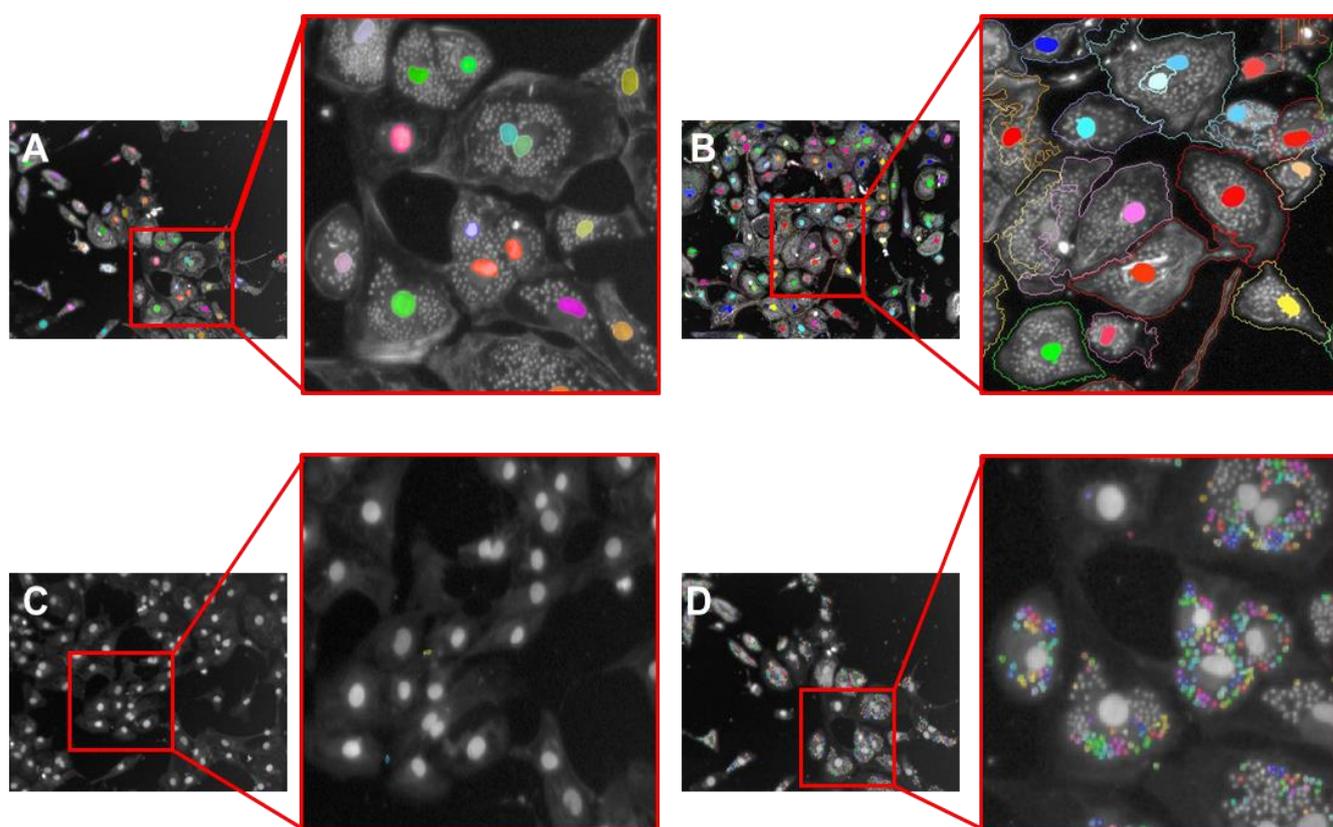


Figura 7: Padronização da análise de imagens no Operetta High Content System. A) Delimitação do núcleo da célula. B) Delimitação da região citoplasmática da célula. C) Controle de células não infectadas. D) Amastigotas intracelulares detectados como *spots* na região do citoplasma.

4.5.2 **Triagem de compostos aplicando ensaio de alto rendimento com o *Operetta High Content System***

As células infectadas foram tratadas com os compostos, os quais foram produzidos com grau de pureza aceitável >95% (BEZERRA et al., 2017), e gentilmente cedidos por parceiros do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do IGM e da Universidade Federal de Pernambuco. Os compostos puros foram dissolvidos em DMSO (Origen), proporcionalmente, para formar a concentração estoque a 10 mM. Foi realizada diluições seriadas dos compostos com o meio de manutenção de cardiomiócitos na proporção 1:5 e as células foram tratadas durante 48 horas. Após o tratamento, foi realizada a aquisição e a análise das imagens no *Operetta High Content Systems*, de acordo com os parâmetros determinados na etapa de padronização do ensaio. Seguindo o fluxo de segmentação celular e seleção de parâmetros, foi possível quantificar o número total de células, o número de células infectadas, o número total de amastigotas, o número de amastigotas por célula e a taxa de infecção (pela razão entre o número de células infectadas e o número total de células). Além disso, foram determinados o CC_{50} (concentração citotóxica para 50% da população de cardiomiócitos), EC_{50} (concentração inibitória para 50% da população de amastigotas) e o índice de seletividade (pela razão entre CC_{50} e EC_{50}). O EC_{50} e o CC_{50} foram utilizados para determinar a potência farmacológica contra amastigotas e a toxicidade do composto em teste à célula hospedeira.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO B (BNP)

Para avaliar possíveis disfunções dos cardiomiócitos, estresse mecânico e processo de hipertrofia, foi utilizado como biomarcador N-terminal do pró-hormônio do peptídeo natriurético do tipo B - NT-pro-BNP liberado em cultura. O sobrenadante das culturas foi coletado para dosagem do nível de NT-pro-BNP. Para isso utilizou-se o kit comercial: Vidas® NT-pro-BNP (Biomerieux, Marcy, França), seguindo as recomendações do fabricante.

4.7 CULTIVO DE *T. CRUZI*

Os experimentos foram realizados com a cepa Y do *T. cruzi*. Tripomastigotas foram obtidos a partir de coleta do sangue de animais da linhagem BALB/c infectados por via intraperitoneal, sete dias pós-infecção. A manutenção da forma tripomastigota foi realizada por sucessivas passagens *in vitro*. Os parasitos na forma tripomastigota foram obtidos a partir do sobrenadante de células da linhagem LLC-MK2 infectadas com a cepa Y.

Os tripomastigotas foram cultivados em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina-streptomicina (10,000 U/mL) (ThermoFisher Scientific), juntamente com células da linhagem LLC-MK2 (ATCC CCL-7) e mantidos em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por sucessivas passagens.

4.8 MODELO DE INFECÇÃO E TESTES DE DROGAS

Como abordagem inicial para triagem de compostos, os testes foram realizados em fibroblastos dermais humanos. Os fibroblastos (6×10^3 células/poço), isolados de material de descarte de cirurgia plástica (procedimento aprovado pelo comitê de ética do Hospital São Rafael, CAAE: 20032313.6.0000.0048), foram incubados em placa de 96 poços em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, as células foram infectadas com 6×10^4 tripomastigotas/poço por 24 horas. Em seguida, os poços foram lavados e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações. Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os poços foram lavados com solução salina, fixados com solução paraformaldeído 4% e corados com 4 µM de Draq5 (Biostatus, Leics, Reino Unido). A aquisição das imagens foi realizada em microscópio confocal Operetta *High-Content Imaging System* (Perkin Elmer, Waltham, EUA). Ao todo foram realizados três experimentos independentes.

As diferentes concentrações dos compostos foram avaliadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% o crescimento (EC₅₀). Os valores de EC₅₀ foram determinados com base na porcentagem de inibição do crescimento e viabilidade do parasito do controle negativo, ou seja, sem adição de droga. O cálculo de regressão não linear para a obtenção dos valores de EC₅₀ foi efetuado a partir do programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software). O fármaco padrão utilizado

como controle positivo foi o benzonidazol. A análise estatística do experimento de infecção de hFIB foi realizada através do programa Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software), utilizando o teste One-Way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni.

4.9 PADRONIZAÇÃO DE INFECÇÃO E TESTES DE DROGAS ANTI-*T. cruzi* EM CARDIOMIÓCITOS

Para os ensaios farmacológicos, foram utilizados cardiomiócitos produzidos a partir de duas linhagens de iPSC no CBTC. Uma terceira linhagem de hiPSC-CM disponível comercialmente (Pluricel, São Paulo, Brasil) também foi utilizada. O ensaio de infecção dos cardiomiócitos foi padronizado com a finalidade de obter o número de células necessários e avaliar diferentes proporções parasito-célula (MOI). No primeiro ensaio de infecção, os cardiomiócitos (2×10^4 células/poço) foram incubados em placa de 96 poços revestidas com Matrigel (Corning) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Após este período, as células foram infectadas com 2×10^5 tripomastigotas/poço, multiplicidade de infecção 10 (MOI=10) por 24 horas ou 1×10^5 tripomastigotas/poço (MOI=5) por 24 horas. Em seguida, o ensaio foi adaptado para placas de 384 poços, utilizando 7×10^3 células/poço e infecção com 3.5×10^4 tripomastigotas/poço (MOI 5) por 24 horas.

Após 24 horas da infecção com *T. cruzi*, os poços foram lavados e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações. Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , os poços foram lavados com solução salina, fixados com solução paraformaldeído 4% e corados com $4 \mu\text{M}$ de Draq5 (Biostatus, Reino Unido). A aquisição das imagens foi realizada em microscópio confocal Operetta High-Content Imaging System (Perkin Elmer).

O teste de ação tripanocida dos fármacos foi iniciada com o fármaco padrão benzonidazol para a padronização inicial do modelo proposto. As diferentes concentrações dos compostos foram avaliadas com a finalidade de determinar a concentração inibitória de 50% do crescimento ou a viabilidade dos parasitos (EC_{50}). Foram utilizados poços controle com solução de DMSO em concentração menor que 0,5%. O valor da EC_{50} foi determinado com base na porcentagem de inibição do crescimento e viabilidade. O cálculo de regressão não linear para a obtenção do valor de EC_{50} foi avaliado utilizando-se no programa Prism 7.04 (GraphPad Software).

4.10 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DOS COMPOSTOS

A atividade citotóxica dos compostos foi feita por contagem do número de células de cada poço (toxicidade letal), através do formato e intensidade de fluorescência do núcleo e do citoplasma, comparado os poços tratados e os não tratados com os compostos. Outras avaliações de toxicidade subletal foram realizadas de modo exploratório, incluindo avaliação do citoesqueleto utilizando marcação com Faloidina-488 e da biomassa de mitocôndria utilizando marcação com Mitotracker Red (ambos da ThermoFisher Scientific).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados obtidos foram analisados utilizando testes estatísticos adequados aos tipos de dados. Dados paramétricos foram avaliados pelo teste *t* de Student. Dados não-paramétricos foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Para comparação entre três ou mais grupos, foi utilizando o teste de ANOVA com pós-teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para dados não paramétricos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os cálculos para a obtenção dos valores de EC_{50} foram efetuados utilizando-se regressão não linear no programa Prism 5.01 GraphPad e o índice de seletividade pela divisão da média dos valores de CC_{50} sobre EC_{50} ($IS = CC_{50} \div EC_{50}$).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS- hiPSC

Foram realizadas as caracterizações de duas linhagens de hiPSC, obtidas de diferentes doadores, com o objetivo de avaliar a pureza da cultura e a manutenção dos marcadores de pluripotência. Foi analisada a expressão do marcador de pluripotência TRA-1-60 por citometria de fluxo e observou-se que as linhagens #1 e #2 expressaram o marcador de pluripotência TRA 1-60 em 94,7% e 98,6%, respectivamente (Figura 8). Através do ensaio de imunofluorescência, avaliou-se a expressão positiva dos marcadores de pluripotência OCT4, NANOG, SOX2, TRA1-60 nas linhagens, confirmando que estas mantinham o estado de pluripotência (Figura 9).

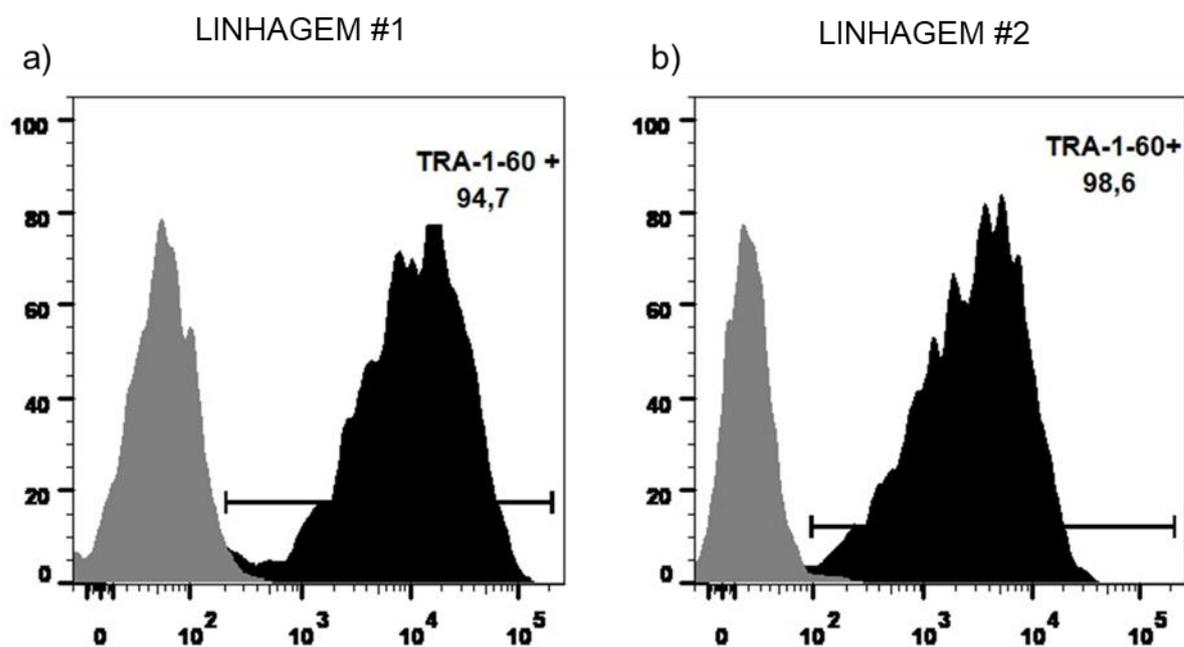


Figura 8:Caracterização de duas linhagens de iPSCs por Citometria de Fluxo. a) Análise de citometria de fluxo da linhagem #1 expressando 94,7% do marcador de pluripotência TRA 1-60. b) Análise de citometria de fluxo da linhagem #2 expressando 98,6% do marcador de pluripotência TRA 1-60.

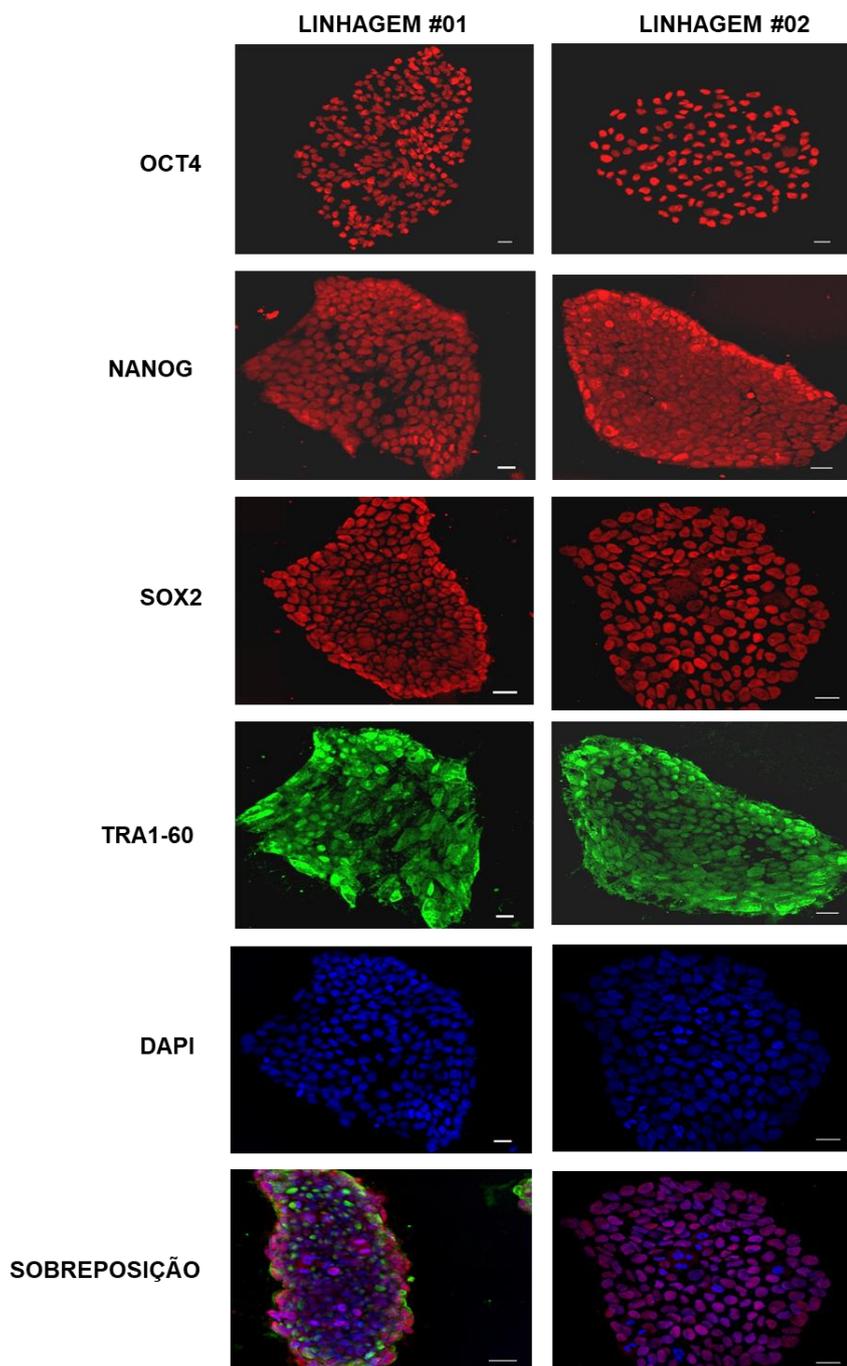


Figura 9: Caracterização das duas linhagens de hiPSC utilizadas no estudo quanto à expressão dos marcadores de pluripotência analisados por microscopia confocal. Ambas as linhagens apresentam marcação positivas para OCT4, NANOG, SOX2, TRA1-60. Núcleos marcados com DAPI (azul). Barras de calibração = 25 μm .

5.2 DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA

A diferenciação de hiPSC-CM foi realizada utilizando kit comercial, composto por três meios distintos, sendo dois meios destinados à indução da diferenciação cardíaca (A e B) e um meio para manutenção dos cardiomiócitos diferenciados (C) (Figura 10A). Foram utilizadas culturas de hiPSCs que apresentavam em torno de 80% de confluência e morfologia característica de células pluripotentes, na ausência de áreas de diferenciação espontânea significativa (Figura 10B). O processo se iniciou com a introdução do meio de diferenciação A, que foi associada a uma intensa mortalidade celular após 24 horas, com redução do número de células nos poços durante as primeiras 48 horas do protocolo (Figuras 10C e D). Após esse período, iniciou-se a segunda fase do protocolo, com a introdução do meio B. Após 24 horas, notou-se que as células remanescentes proliferaram e, após 48 horas, foi observada a confluência das células nos poços de cultura (Figuras 10E e F). Foi introduzido então o meio de manutenção C, onde observou-se gradativamente a formação de sincícios e, a partir do dia 10 da diferenciação, foi observado o surgimento das primeiras áreas com contrações espontâneas, que se intensificaram nos dias subsequentes (Figuras 10G-J). Para confirmação da diferenciação cardíaca e determinação da eficiência do método, foi realizada análise de citometria de fluxo para o marcador de cardiomiócitos Troponina cardíaca T (cTnT), que demonstrou um percentual de 83% de células positivas para cTnT (Figura 11A). O grupo controle apresentou 2.53% de células positivas para cTnT (Figura 11B).

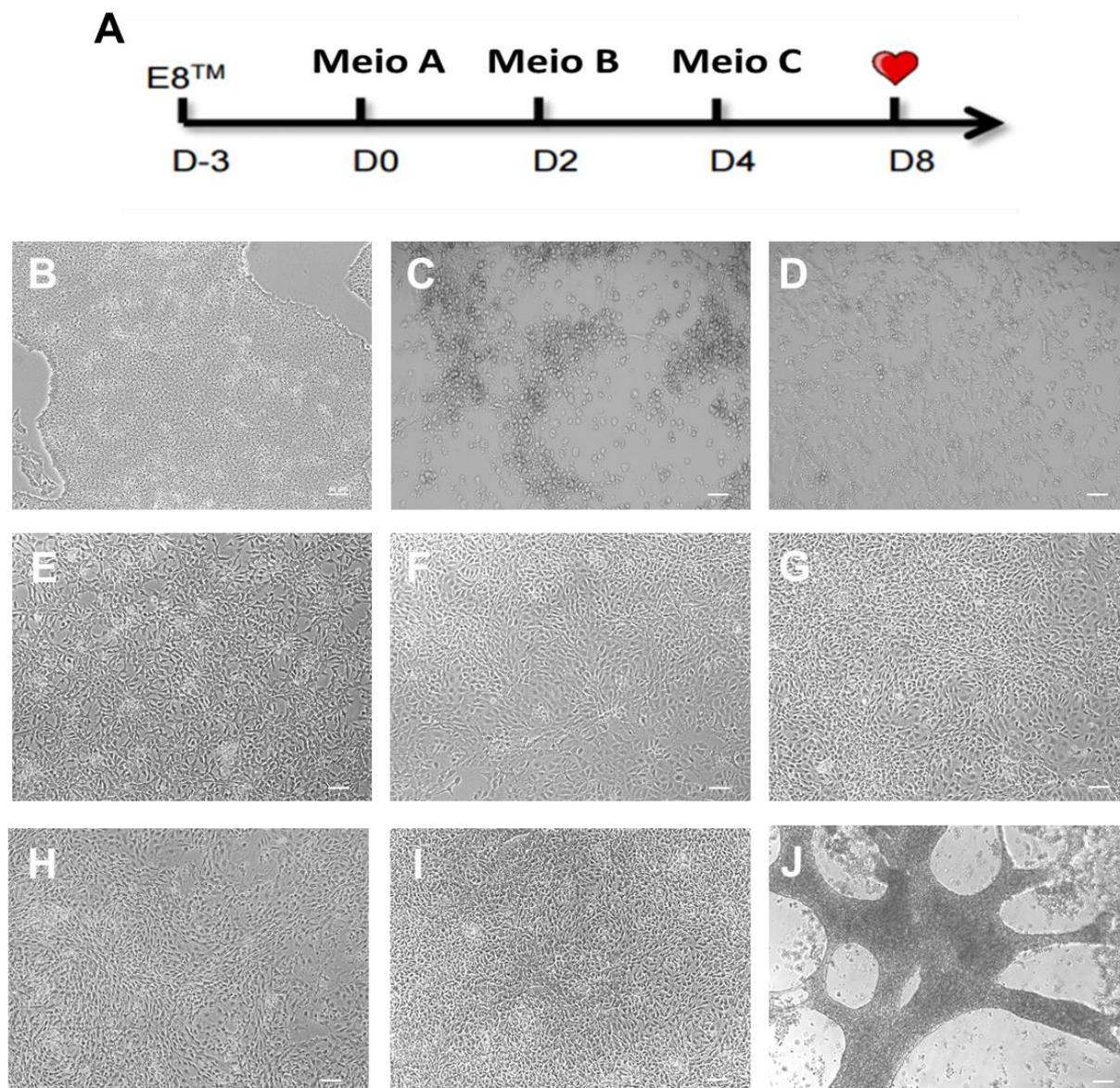


Figura 10: Etapas da diferenciação cardíaca visualizadas por microscopia de contraste de fase. . A) Linha temporal ilustrando as etapas do protocolo de diferenciação. B) Morfologia da cultura de hiPSC antes do início do protocolo de diferenciação. C) Perda maciça de células observada 24 horas após a introdução do meio de diferenciação A. D) Redução da celularidade observada 48 horas após a introdução do meio A. E) 24 horas de ação do meio B, observa-se mudança na morfologia das células e intensa proliferação celular. F) 48 horas após a introdução do meio B é atingida a confluência. G) 24 horas do meio C. H) 48 horas após introdução do meio C. I) Dia 8 da diferenciação, quando ocorre o surgimento das primeiras áreas contráteis. J) Dia 14 de diferenciação, onde já pode ser observada a formação dos sincícios. Barras de calibração = 50 μm .

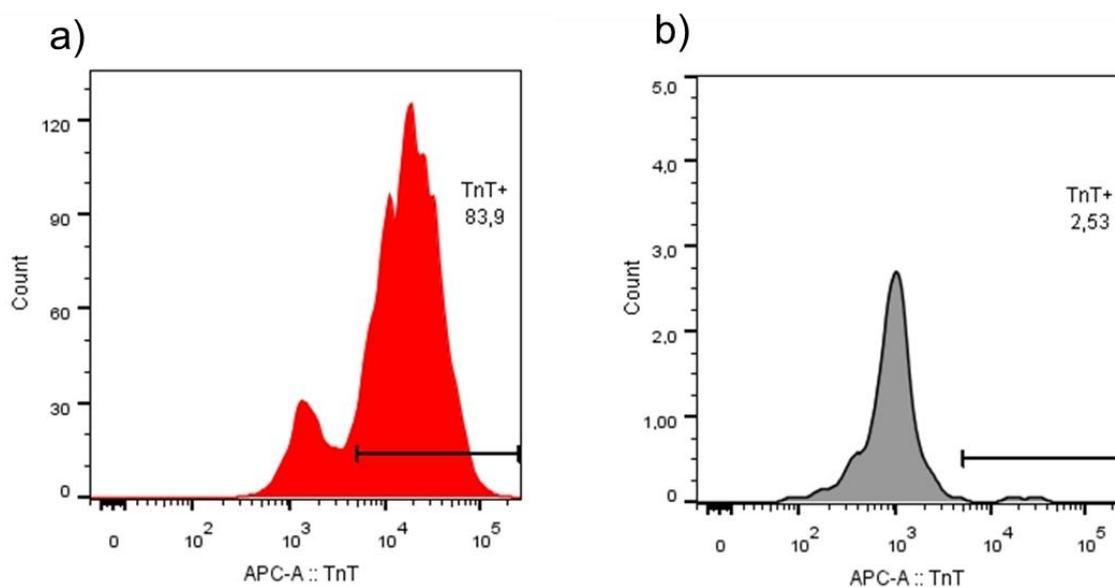


Figura 11: Expressão de troponina T cardíaca em hiPSC-CM avaliada por citometria de fluxo. A análise foi realizada no D15 da diferenciação. A) Histograma demonstrando o percentual de células positivas para cTnT no *pool* de células induzidas à diferenciação cardíaca e nos poços controle (B), em que o *pool* de células foi mantido em meio de iPSC.

5.3 PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO E ENSAIO FARMACOLÓGICO

Para a padronização do protocolo de infecção de hiPSC-CM, foram testadas duas razões parasito/célula (MOIs) diferentes, MOI=5 e MOI=10 e foi avaliado o percentual de infecção e número total de cardiomiócitos por poço, com a finalidade de obter a concentração de célula necessária e a MOI ideal para que houvesse o mínimo de 50% de infecção das células. Na MOI=10, houve uma perda de aproximadamente 47% dos cardiomiócitos, quando comparado aos cardiomiócitos não infectados (Figura 12 C). Já no grupo infectado com MOI=5, não houve diferença estatística quando comparado aos cardiomiócitos não infectados (Figura 12 D). Em relação à porcentagem de infecção, o grupo infectado com MOI=10 apresentou uma média de 49% de células infectadas, enquanto que, com a MOI=5 observou-se média de 58% de células infectadas ($p < 0.05$) (Figura 12 E). Deste modo, a MOI=5 foi utilizada nos experimentos subsequentes.

Na segunda parte da padronização, os cardiomiócitos foram tratados com a droga padrão, benzonidazol, em diferentes concentrações. O benzonidazol foi eficaz

na redução dos amastigotas e percentual de infecção, apresentando um EC_{50} de $6.1\mu M$ em hiPSC-CM (Figura 13 A). Nas concentrações testadas, não foi observada redução no número de cardiomiócitos (Figura 13 B). Em relação à taxa de infecção, foi observado um efeito anti-*T. cruzi* concentração-dependente (Figura 13 C).

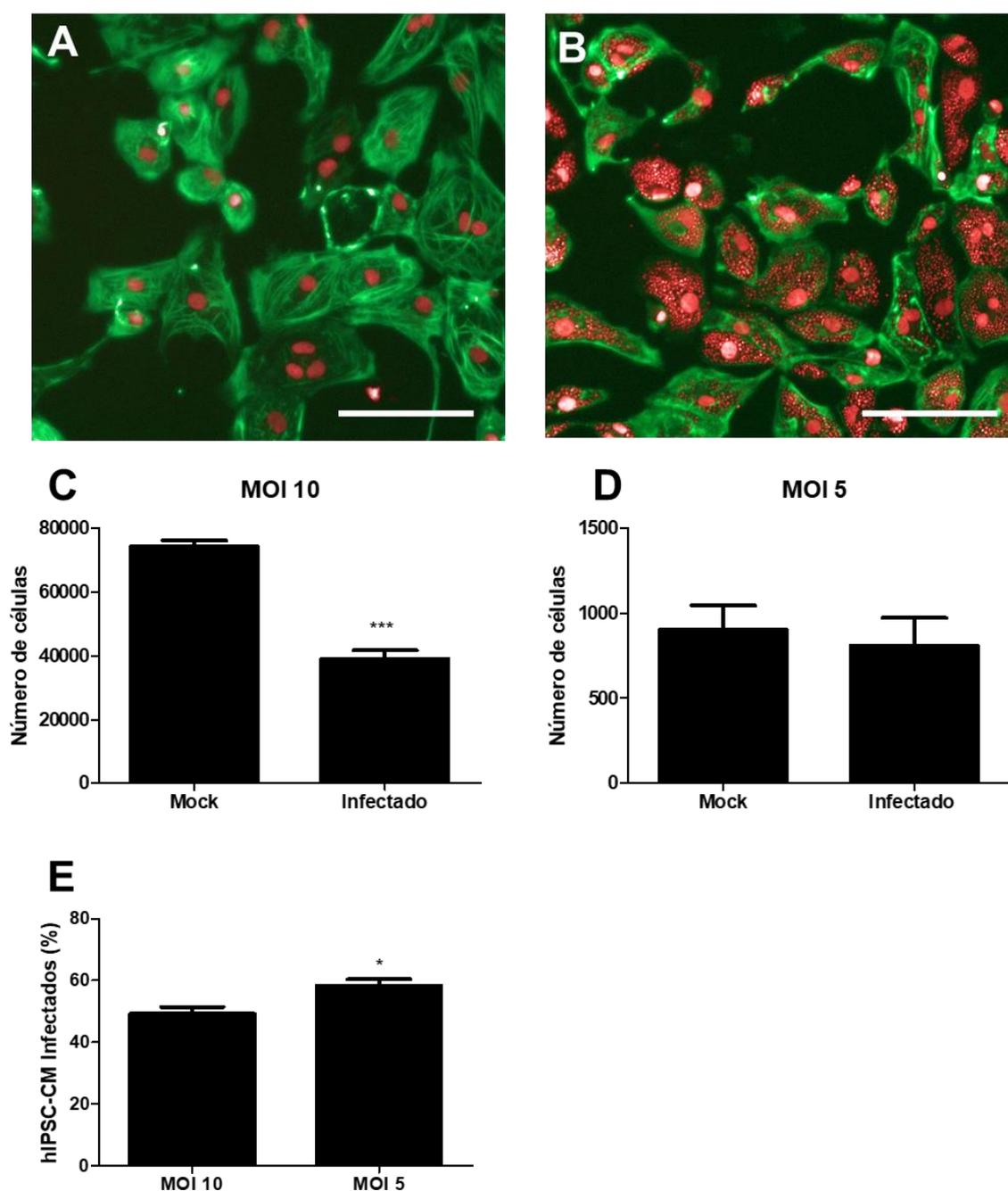


Figura 12: Padronização do protocolo de infecção de hiPSC-CM com *T. cruzi*. A) Imagem representativa de hiPSC-CM controles não infectados, demonstrando positividade para cTnT (verde) e núcleo marcado com Draq5 (vermelho). B) Imagem representativa de hiPSC-CM infectados com *T. cruzi*, com marcação positiva para cTnT (verde), núcleo e amastigotas marcados com Draq5 (vermelho). C) Número de cardiomiócitos no grupo *mock* e infectado com MOI=10. D) Número de

cardiomiócitos no grupo *mock* e infectado na MOI 5. E) Porcentagem de infecção na MOI=10 e MOI=5. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. Barras de calibração = 50 μm .

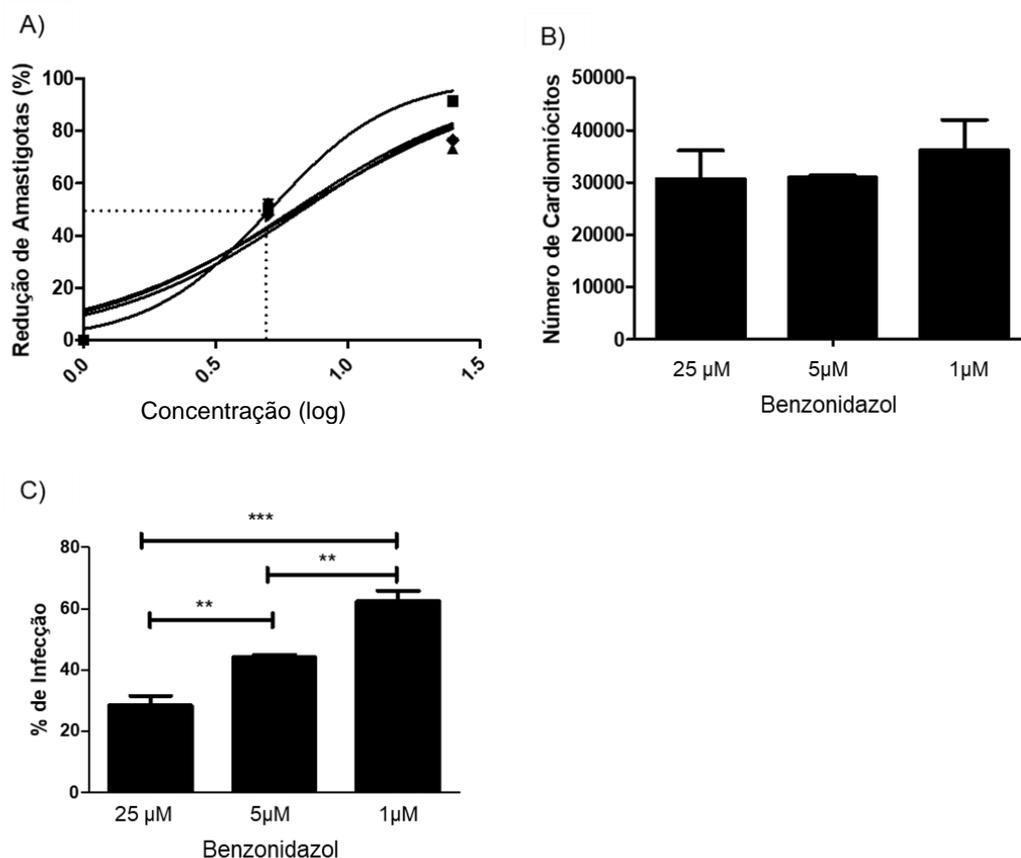


Figura 13: Avaliação da ação do benznidazol em hiPSC-CM infectados com *T. cruzi*. A) Porcentagem da redução de amastigotas com benznidazol em diferentes concentrações (log) com o EC₅₀ de 6.1 μM . B) Número de cardiomiócitos para as três concentrações testadas de benznidazol. C) Porcentagem de infecção com as três concentrações testadas de benznidazol. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

5.4 TRIAGEM DE COMPOSTOS ANTI-*T. cruzi* EM hiPSC-CM

Após a padronização do ensaio de infecção e ação farmacológica, realizamos a triagem de três compostos com ação anti-*T. cruzi* reportada na literatura. Dois destes compostos são derivados cíclicos da tiazolidinona - GT5A e GT5B - e o derivado do ácido betulínico - BA5 - pertencente à classe dos triterpenos. Após incubação com os referidos compostos, foi observada atividade dos três compostos testados, quanto à inibição da infecção, apresentando valores de EC₅₀ inferiores ao do fármaco padrão benznidazol. A partir do valor de EC₅₀ e CC₅₀ da forma amastigota, foi possível calcular o índice de seletividade (IS), que é a razão entre a CC₅₀ e a EC₅₀. O IS indica o quão seletivo o composto é ao parasito em relação aos hiPSC-CMs. Dentre

os compostos testados, o benzonidazol apresentou o maior valor de CC_{50} , seguido de GT5A. O composto GT5B apresentou o menor valor de EC_{50} e maior valor de IS (Tabela 2).

Tabela 2: EC_{50} , CC_{50} e índice de seletividade dos compostos

COMPOSTOS	AMASTIGOTAS	hiPSC-CM	IS
	$EC_{50} \pm SEM (\mu M)$	$CC_{50} \pm SEM (\mu M)$	
BA5	$3,2 \pm 0,8$	$37 \pm 1,9$	12
GT5A	$1,9 \pm 0,6$	87 ± 22	46
GT5B	$0,08 \pm 0,02$	$27 \pm 3,5$	338
BNZ	$5,9 \pm 0,5$	>100	>17

IS - Índice de seletividade (CC_{50}/EC_{50})

EC_{50} - Concentração Efetiva em 50%

CC_{50} - Concentração Citotóxica em 50%

SEM - Erro padrão da média

5.5 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE SUBLETAL

Com o objetivo de incluir no ensaio a análise de outros parâmetros de toxicidade subletal, foi realizada a padronização da marcação de hiPSC-CM com faloidina e mitotracker, além da coleta do sobrenadante para quantificação de NT-Pro-BNP, após a incubação com compostos de referência. Foram realizados testes com $0,1 \mu M$ de doxorubicina, agente cardiotoxico, e 10 ng/ml de endotelina-1 (ET-1), agente hipertrófico. Os testes foram realizados após incubação por 1 ou 48 horas.

A incubação com ET-1 foi associada a sinais de hipertrofia celular (Figura 14), com aumento da intensidade da marcação do citoesqueleto marcado com faloidina, comparadas ao grupo controle não tratado, e ao tratado com doxorubicina, que se apresentou com uma desestruturação com citoesqueleto, redução da intensidade de fluorescência de faloidina e redução do tamanho das células. Este resultado foi corroborado pela presença de níveis elevados de NT-Pro-BNP no sobrenadante das culturas de hiPSC-CM tratadas com ET-1 e redução no tratamento com doxorubicina (Figura 14C). Além disso, observamos a redução no número de células nos poços tratados com doxorubicina, quando comparados ao grupo controle e o tratado com ET-1 (Figuras 14 A e D).

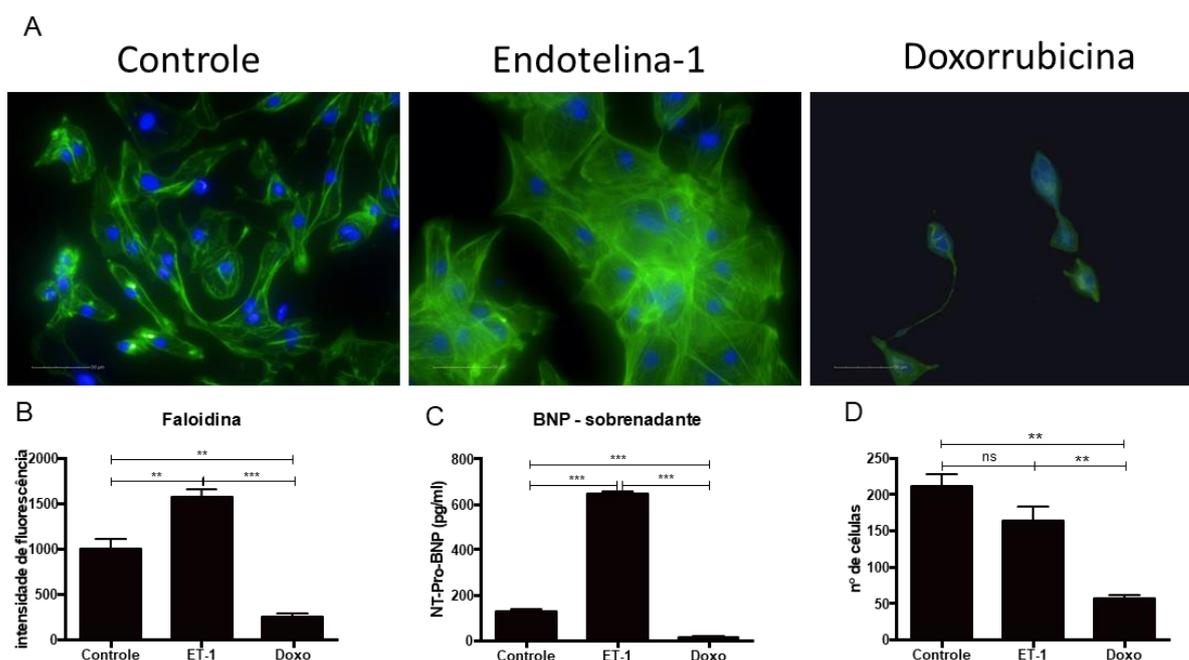


Figura 14: Análises de toxicidade subletal através de marcação do citoesqueleto e dosagem de BNP. A) Imagens representativas adquiridas no *Operetta High Content System*, onde é possível observar hiPSC-CM do grupo Controle, grupo tratado com endotelina-1 e grupo tratado com doxorubicina, com a marcação para faloidina (verde) e núcleos corados com DAPI (azul). B) Quantificação da intensidade de fluorescência da faloidina nos grupos analisados. C) Níveis de BNP nos sobrenadantes das culturas de hiPSC-CM submetidos aos diferentes tratamentos. D) Número de células dos grupos. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Após a padronização do ensaio, foi realizada então a avaliação da intensidade de fluorescência de faloidina após 48 horas de incubação com os compostos benzonidazol, BA5, GT5A e GT5B após 48 horas de tratamento, em diferentes concentrações. O BA5 causou uma redução da intensidade de fluorescência de faloidina, concentração-dependente, com $EC_{50}=8,3 \mu\text{M}$ e diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle (Figura 15A). O composto GT5A, mostrou redução estatisticamente significativa da intensidade de fluorescência da faloidina nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 μM , com $EC_{50}=26,1 \mu\text{M}$ (Figura 15B). O composto GT5B causou uma redução estatisticamente significativa da intensidade de fluorescência da Faloidina quando tratado nas concentrações 6,25, 12,5 e 50 μM , com $EC_{50}=1,9 \mu\text{M}$ (Figura 15C). O benzonidazol também causou redução da intensidade de fluorescência significativa nas concentrações 12,5, 25, 50 μM , com $EC_{50}>100 \mu\text{M}$ (Figura 15D).

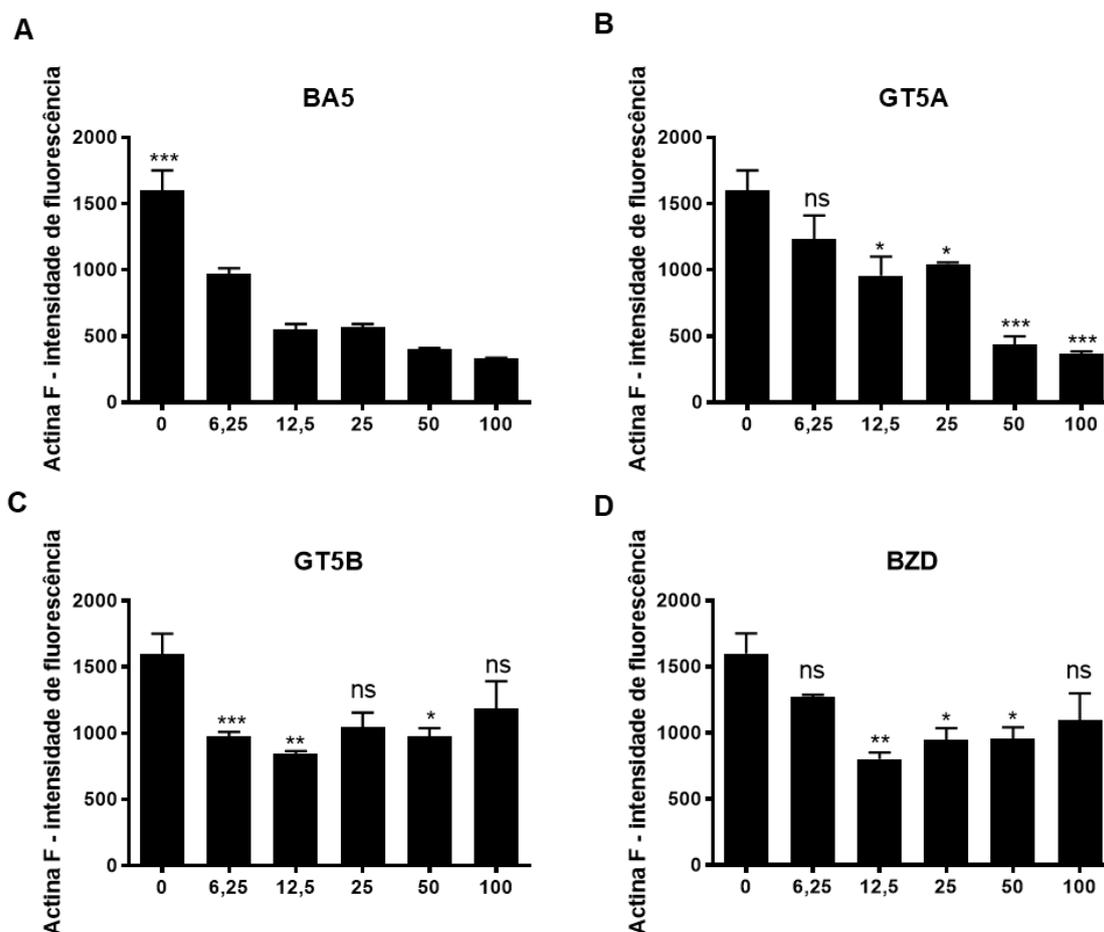


Figura 15: Intensidade de fluorescência da faloidina (Actina F). A) Redução concentração-dependente da intensidade de fluorescência da faloidina tratadas com BA5. B) Redução estatisticamente significativa, da intensidade de fluorescência da faloidina nas concentrações de 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µM de GT5A C) Redução estatisticamente significativa da intensidade de fluorescência da faloidina quando tratado nas concentrações 6.25, 12.5, 50 µM com GT5B. D) redução da intensidade de fluorescência significativa nas concentrações 12.5, 25, 50 µM tratados com benzonidazol. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Considerando as alterações observadas no citoesqueleto após incubação com BA5, GT5A e GT5B, foi realizada uma análise exploratória dos níveis de NT-pro-BNP. Foi coletado um *pool* dos sobrenadantes dos poços com as réplicas das concentrações dos compostos testados. O composto BA5 mostrou níveis elevados de BNP nas concentrações 2.5, 5, 10 e 20 µM comparados à ET-1 (Figura 16A). Já os compostos GT5A e GT5B não apresentaram níveis de NT-pro-BNP maiores que da ET-1 nas diferentes concentrações testadas (Figuras 16B e C). Todos os compostos mostraram níveis maiores que o controle nas concentrações testadas (Figuras 16 A, B e C).

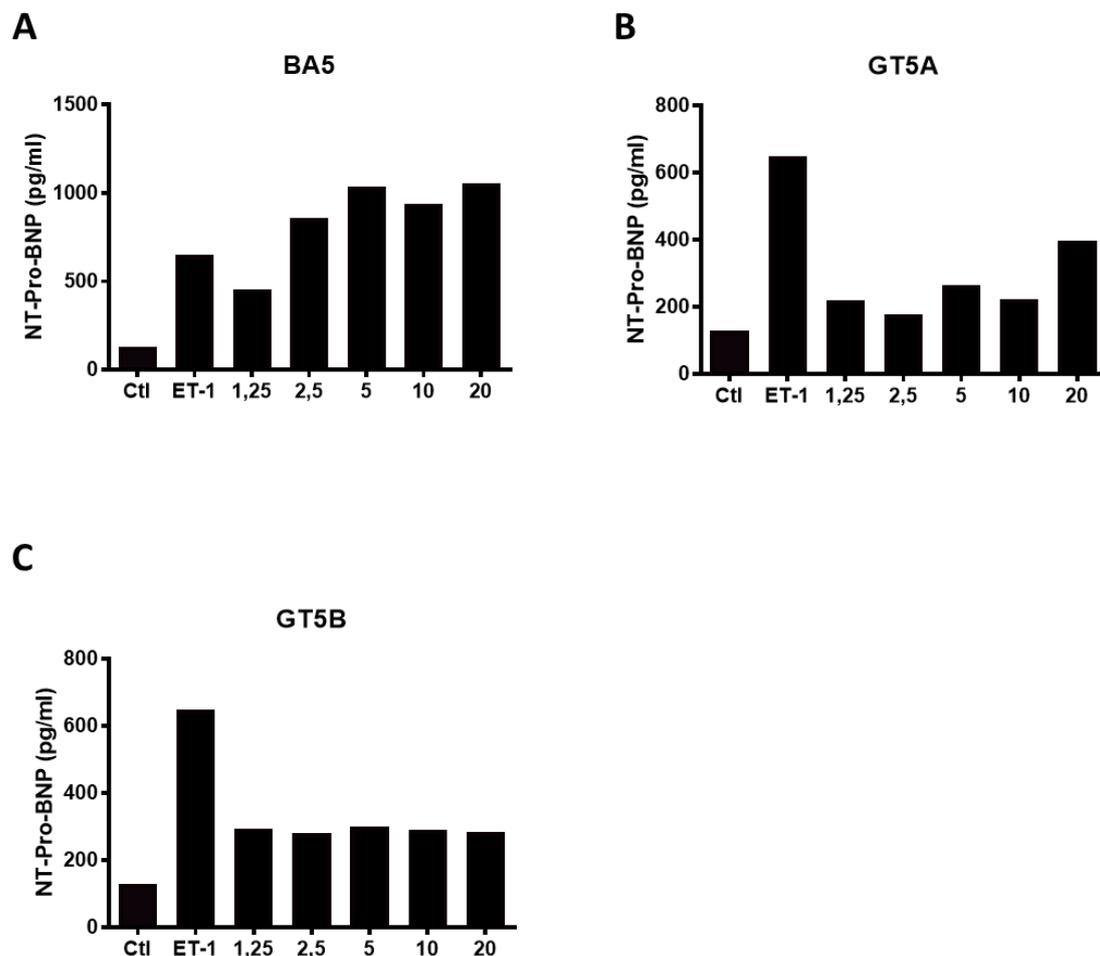


Figura 16: Avaliação dos níveis de NT-pro-BNP no sobrenadante das culturas de hiPSC-CM. A) Níveis elevados de NT-pro-BNP foram observados nas concentrações 2.5, 5, 10 e 20 μ M com o composto BA5 comparados à Endotelina-1 B) Níveis de NT-pro-BNP do composto GT5A. C) Níveis de BNP do composto GT5B.

Em seguida, foi realizada a padronização do ensaio de avaliação de toxicidade mitocondrial, através da marcação com mitotracker, sonda molecular fluorescente que se concentra em mitocôndrias ativas, permitindo avaliar a função mitocondrial. Para avaliar a toxicidade mitocondrial, as células foram marcadas com mitotracker após incubação com doxorubicina, um composto que afeta a função mitocondrial no cardiomiócitos. Observamos que, após 1 hora de incubação com doxorubicina a 0,1 μ M, houve redução da marcação com mitotracker, que se intensificou no ponto de 48 horas (Figuras 17A e B).

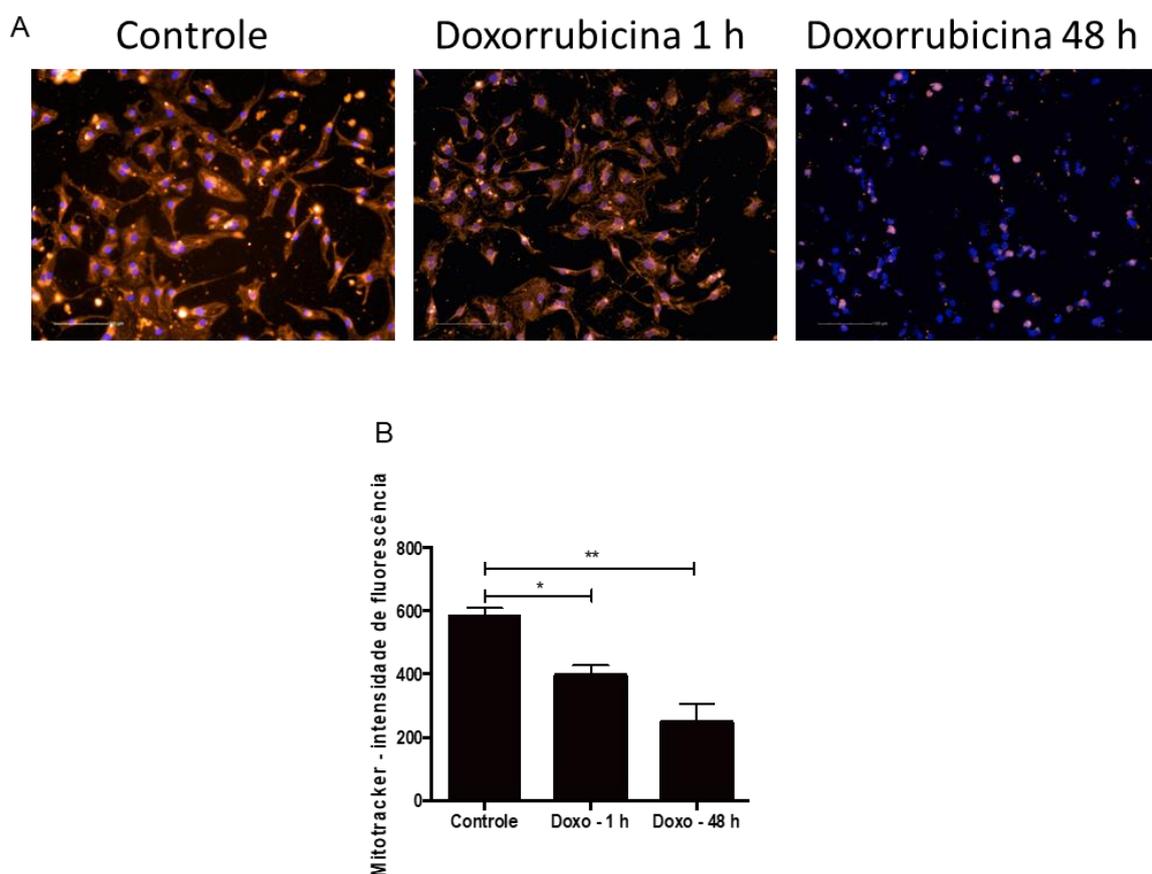


Figura 17: Avaliação de toxicidade mitocondrial após incubação de hiPSC-CM com doxorubicina. A) Imagens de hiPSC-CM adquiridas no *Operetta High Content System* com marcação mitocondrial utilizando mitotracker do grupo controle, tratados com doxorubicina 0,1 μM por 1h e 48h. B) Intensidade de fluorescência do mitotracker nos grupos tratados e controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Após o estabelecimento do ensaio, avaliamos a toxicidade mitocondrial dos compostos BA5, GT5A e GT5B em culturas incubadas por 1 hora e 48 horas. O tratamento com BA5 por 1 hora foi associado à toxicidade mitocondrial, com redução da marcação com mitotracker concentração-dependente e $\text{EC}_{50}=40 \mu\text{M}$ (Figura 18A). Os demais compostos, GT5A e GT5B, não causaram redução da marcação com mitotracker no ponto de 1 hora de incubação.

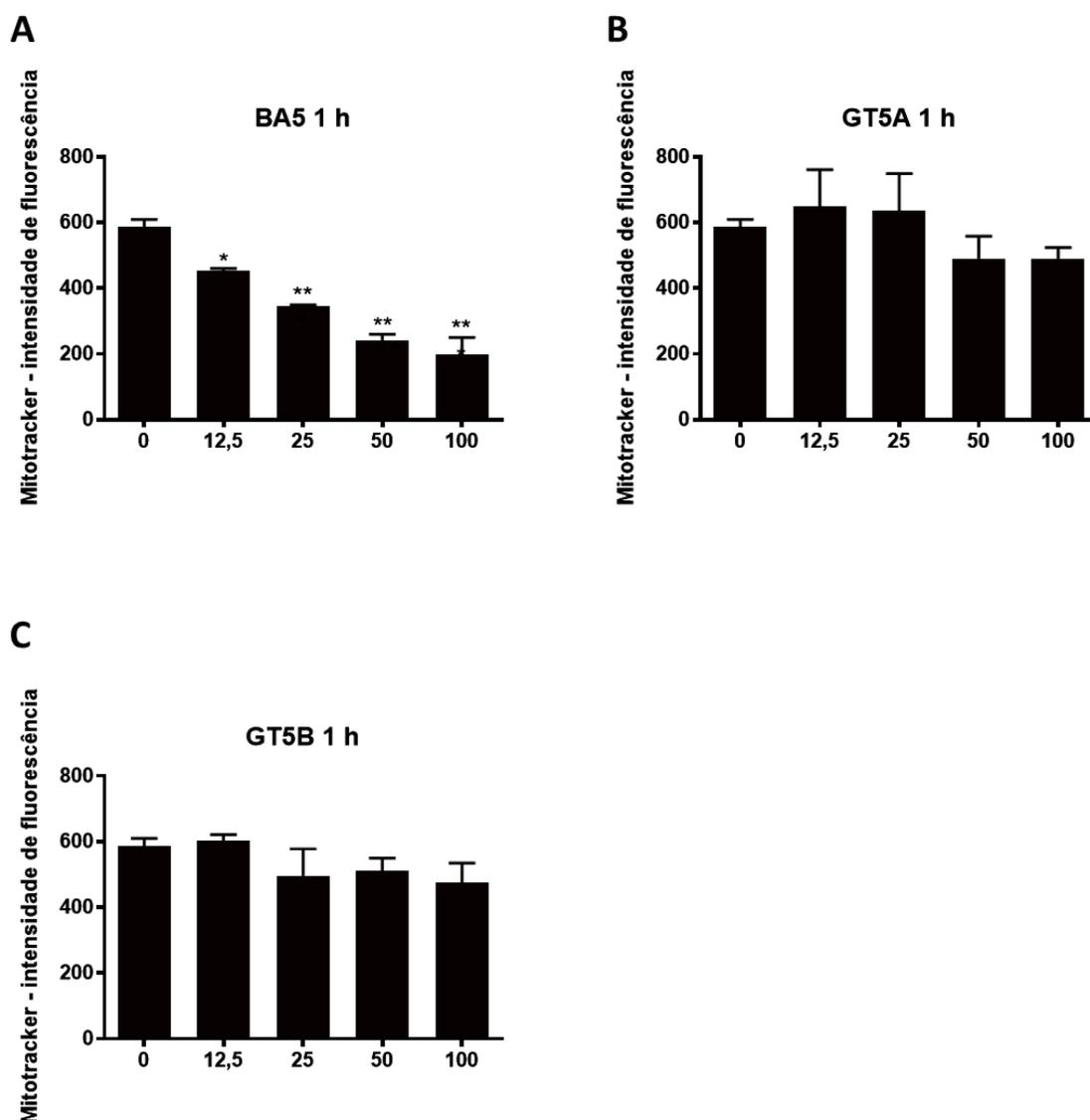


Figura 18: Avaliação de toxicidade mitocondrial após 1 hora de tratamento com os compostos. A) Intensidade de marcação com Mitotracker avaliada após 1 hora de incubação com BA5, demonstrando toxicidade mitocondrial concentração-dependente. B) Intensidade de marcação com Mitotracker avaliada após 1 hora de incubação com GT5A, que não apresenta alterações quando comparado ao controle. C) Intensidade de marcação com Mitotracker avaliada após 1 hora de incubação com GT5B, que não apresenta alterações quando comparado ao controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

A intensidade de marcação com mitotracker foi novamente avaliada após 48 horas de tratamento com os compostos. Diferentemente do que foi observado no ponto de 1 hora, o BA5 mostrou aumento da intensidade de fluorescência estatisticamente significativa nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 μM (Figura 19A). O composto GT5A mostrou aumento estatisticamente significativo da intensidade de fluorescência nas concentrações 25, 50 e 100 μM (Figura 19B). O composto GT5B teve aumento estatisticamente significativo somente na concentração

mais alta testada, 100 μ M (Figura 19C). O benzonidazol também se associou a um aumento da intensidade de fluorescência significativa nas concentrações 6.25, 25, 50 e 100 μ M (Figura 19D).

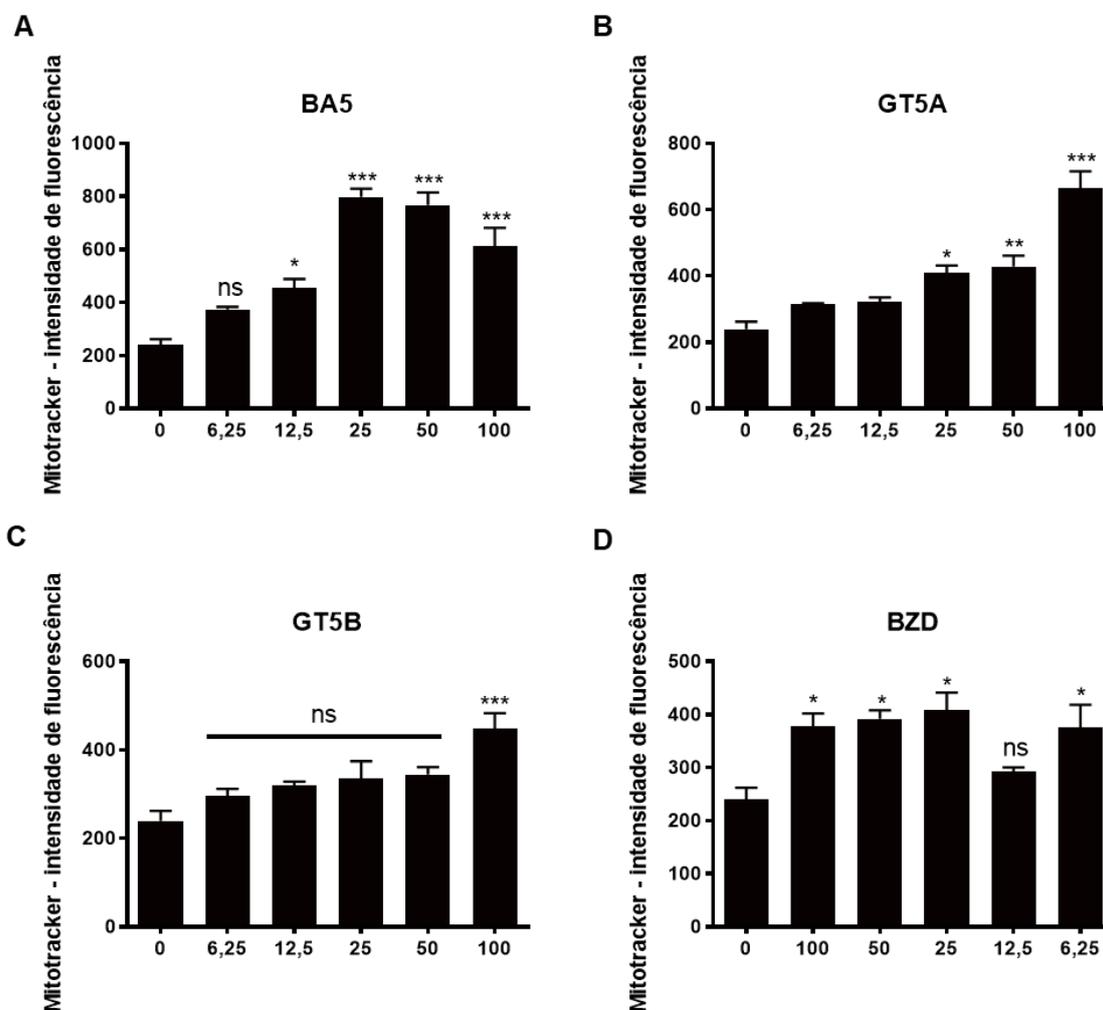


Figura 19: Avaliação de toxicidade mitocondrial após 48 horas de tratamento com os compostos. A) Intensidade de marcação com mitotracker avaliada após 48 horas de incubação com BA5 demonstrando aumento da intensidade concentração-dependente B) Intensidade de marcação com mitotracker avaliada após 48 horas de incubação com GT5A demonstrando aumento da intensidade concentração-dependente. C) Intensidade de marcação com mitotracker avaliada após 48 horas de incubação com GT5B, que não apresenta alterações quando comparado ao controle exceto a concentração mais alta de 100 μ M. D) Intensidade de marcação com mitotracker avaliada após 48 horas de incubação com benzonidazol (BDZ). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. ns = Não significativo

6 DISCUSSÃO

Cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC-CMs) têm potencial para contribuir no processo de desenvolvimento de drogas, através do estabelecimento de ensaios mais preditivos de eficácia e segurança. Um dos principais fatores de retirada de drogas do mercado decorre de cardiotoxicidade não identificada nos ensaios pré-clínicos e clínicos realizados no processo de desenvolvimento, resultando em eventos adversos graves e até mesmo fatais (SANCHEZ-FREIRE et al., 2014). Considerando a necessidade de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas, iniciamos, no presente trabalho, a padronização de um ensaio farmacológico multiparamétrico para avaliação simultânea de cardiotoxicidade e atividade anti-*T. cruzi*, utilizando hiPSC-CM.

Os hiPSC-CMs podem ser gerados em larga escala a partir de hiPSC, auxiliando tanto na detecção precoce de cardiotoxicidade quanto na descoberta de novas drogas, podendo ser usados também para modelagem de doenças. Neste estudo, utilizamos hiPSC-CM para avaliar, simultaneamente, a atividade anti-*T. cruzi* e a cardiotoxicidade de compostos químicos selecionados. Foram produzidos hiPSC-CM, que foram utilizados para padronizar ensaio de infecção por *T. cruzi*, e ensaio de triagem de drogas com ação tripanocida, também avaliando a cardiotoxicidade letal e subletal dos compostos testados.

A literatura reporta diversas maneiras de diferenciar cardiomiócitos a partir de hiPSCs. A eficiência da diferenciação cardíaca, entretanto, é dificultada por inconsistências e pela baixa reprodutibilidade do processo entre linhagens e até mesmo entre experimentos. Esta variabilidade está associada a especificidades das linhagens celulares, a processos estocásticos, condições de cultivo como a fase do ciclo celular, densidade e confluência, dentre outros (LACO et al., 2018). No nosso estudo, utilizamos kit comercial com adaptações para estabelecimento do protocolo para que a eficiência da diferenciação fosse otimizada em dois clones de hiPSC distintos. Ambos mostraram taxa de eficiência satisfatória, na faixa de 80%, quando utilizado como critério o percentual de células positivas para troponina T cardíaca. Taxas semelhantes de eficiência da diferenciação foram reportadas para estudos prévios, que utilizaram modulação da via Wnt com pequenas moléculas para obtenção

dos hiPSC-CM (FOR, 2017; KADARI et al., 2015; LACO et al., 2018). O resultado do protocolo de diferenciação obtido foi então considerado satisfatório, mas poderá ser complementado no futuro com outras estratégias para obter culturas ainda mais enriquecidas em cardiomiócitos.

Para maximizar a pureza dos cardiomiócitos, comumente é empregado o método de seleção metabólica, baseado na capacidade exclusiva de hiPSC-CM de sobreviver em ambiente livre de glucose e piruvato, utilizando lactato como substrato para síntese de ATP. Para isso, o meio de cultura é substituído por outro sem glucose e suplementado com lactato, o que induz outras células, não cardíacas, a morrer durante este processo. Após quatro dias, o resultado são colônias de cardiomiócitos puras, variando de 90-99% cTnT positivas (KADARI et al., 2015). Tendo em vista que protocolos de purificação não foram realizados no presente estudo, utilizamos imunofluorescência com marcação para troponina T cardíaca, para que as análises fossem realizadas apenas na população de hiPSC-CM.

Além da pureza da cultura, o nível de maturação dos cardiomiócitos também podem afetar os resultados dos experimentos. Uma limitação do presente estudo envolve o grau de maturidade dos hiPSC-CMs. Até o momento, os hiPSC-CMs que foram utilizados para o teste de cardiotoxicidade exibem um fenótipo estrutural compatível com cardiomiócitos fetais. O estágio de desenvolvimento dos hiPSC-CM utilizados neste estudo está de acordo com a literatura, que reporta que a diferenciação cardíaca de hiPSC leva, rotineiramente, à geração de células com um fenótipo estrutural e funcional imaturo, do tipo fetal (HERRON et al., 2016). No entanto, o impacto que o estado de maturação dos hiPSC-CMs tem sobre a capacidade de reação aos compostos não é claro (FEASTER et al., 2015; HERRON et al., 2016). Considerando que o grau de maturação dos hiPSC-CMs pode ser um fator crítico para obtenção de ensaios mais preditivos, novos estudos deverão ser realizados para otimizar o processo de obtenção destas células. Já existem relatos na literatura de métodos para indução de maturação, inclusive através da modulação da resistência mecânica (pós-carga), em hiPSC-CM cultivados em 3D (LEONARD et al., 2018).

Uma vez obtidos os hiPSC-CMs, padronizamos o protocolo de infecção com *T. cruzi* utilizando duas MOIs diferentes, MOI=5 e MOI=10, para avaliar o percentual de

infecção e número total de cardiomiócitos por poço visando obter a concentração de célula necessária e a MOI ideal para que houvesse o mínimo de 50% de infecção das células. Observamos que os hiPSC-CM são bastantes susceptíveis à infecção por *T. cruzi*, já que utilizando MOI=10, comumente utilizada para infecção de outros tipos celulares, como fibroblastos dermais humanos, houve uma perda de aproximadamente 47% dos cardiomiócitos. Reduzindo a MOI à metade, foi possível obter uma taxa de infecção satisfatória e manutenção do número de células em nível semelhante aos controles não infectados. Além disso, observamos que o aumento da MOI foi associado a uma redução na taxa de infecção, de 58% na MOI=5, para 49% na MOI=10. Este achado pode estar relacionado à perda celular ocorrida quando a infecção foi realizada na MOI 10, que apresentou alta taxa de morte celular, prejudicando a viabilidade das células e, conseqüentemente, o percentual de infecção.

Após a padronização da infecção, foi realizado o teste de tratamento com o fármaco padrão benzonidazol, tendo sido obtido o valor de EC₅₀ de 6,1 µM em hiPSC-CM. Este valor está de acordo com a faixa de valores de EC₅₀ reportada na literatura, que varia na dependência da linhagem celular avaliada nos experimentos. A exemplo, na linhagem de mioblastos L6, foi reportado EC₅₀ de 8,5 µM, enquanto que em macrófagos foi reportado o valor de 2,8 µM e em fibroblastos dermais humanos, foi relatado o valor de 9,8 µM (BOTERO et al., 2017; MOREIRA et al., 2013; RODRIGO et al., 2015).

Considerando que os hiPSC-CM são células pós-mitóticas, utilizamos neste trabalho o número de células como medida de toxicidade, além de outros parâmetros para avaliação de toxicidade subletal, como a organização do citoesqueleto, conteúdo de mitocôndria e dosagem de NT-pro-BNP, marcador de estresse celular no cardiomiócito. Além dos parâmetros acima descritos, a cardiotoxicidade vem sendo também avaliada através de análises de eletrofisiologia. Há drogas, no entanto, que não comprometem a eletrofisiologia da célula mas são cardiotóxicas por causar danos diretamente aos cardiomiócitos em níveis subcelular e molecular através da formação de estresse oxidativo causado pela produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, danos no DNA, dano mitocondrial, apoptose (CHAUDHARI et al., 2016). É o caso da doxorrubicina, que se liga à cardiolipina e entra na mitocôndria, inibindo a cadeia respiratória e a despolarização do potencial de membrana, dentre outros

mecanismos (SHI et al., 2018). No presente estudo, utilizamos doxorrubicina como controle positivo no ensaio de avaliação mitocondrial através de marcação com corante MitoTracker Red CMXRos, que se acumula em mitocôndrias, em células vivas, de modo dependente do potencial de membrana mitocondrial (KODIHA et al., 2015). Conforme esperado, observamos que hiPSC-CM incubados com doxorrubicina rapidamente reduziram a marcação com mitotracker, o que se intensificou com o passar do tempo, denotando um comprometimento progressivo da função mitocondrial, que foi acompanhado de morte celular.

As mitocôndrias estão envolvidas em várias funções dos cardiomiócitos, incluindo, metabolismo de ácidos graxos, aminoácidos e geração da ATP. Como subprodutos desse processo, formam-se espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar várias biomoléculas, levando à disfunção mitocondrial (FISCHER; HAMANN; OSIEWACZ, 2012). Mitocôndrias disfuncionais podem comprometer a função miocárdica (VARGA et al., 2015). Os cardiomiócitos utilizam uma enorme quantidade de ATP, estando em constante estado contrátil e de consumo de energia. Para manter a produção constante de ATP, mitocôndrias disfuncionais são substituídas por organelas recém-sintetizadas por processos envolvendo biogênese e replicação mitocondriais (FISCHER; HAMANN; OSIEWACZ, 2012). Algumas drogas podem ser cardiotoxícas através da indução de dano mitocondrial, aumentando o estresse oxidativo, ativando vias de resposta de dano ao DNA e aumentam a apoptose (SALA, 2017). As análises realizadas no nosso estudo poderão ser complementadas com outras análises, como a utilização de corantes para quantificar a produção de EROs mitocondriais (TALBERT et al., 2015).

Anormalidades na estrutura celular têm sido propostas como contribuintes para anormalidades na eletrofisiologia celular e arritmias associadas a fatores agudos isquêmicos ou hemodinâmicos no coração. A estabilidade mecânica da célula cardíaca, depende da integridade do citoesqueleto e mudanças geométricas na membrana celular podem levar a alterações na eletrofisiologia (YANG et al., 2002). Em linhas gerais, estudos reportam cardiotoxicidade avaliando a fisiologia dos cardiomiócitos como fluxo de íons e potencial de membrana mitocondrial (eletrofisiologia), viabilidade celular, dano físico (MERCOLA; COLAS; WILLEMS,

2013; SIRENKO et al., 2018). Algumas drogas podem induzir desorganização do citoesqueleto, estresse mecânico ou mesmo estimular uma resposta hipertrófica.

No presente estudo, utilizamos a marcação com faloidina para avaliação do citoesqueleto e, utilizando controles positivos, observamos que esta análise é capaz de demonstrar, quantitativamente, resposta hipertrófica (avaliada com o tratamento com endotelina-1) e desestruturação do citoesqueleto (observada com o tratamento com doxorubicina). Interessantemente, estes achados se correlacionaram com níveis aumentados de liberação do biomarcador NT-pro-BNP para o meio de cultura na resposta hipertrófica induzida por ET-1, enquanto que níveis reduzidos foram observados no caso do tratamento com doxorubicina, o que está de acordo com observações prévias da literatura (LOUISSE et al., 2017). O BNP é um neuro-hormônio cardíaco sintetizado nos ventrículos cardíacos como resultado do aumento do estresse. Níveis plasmáticos de BNP são usados como marcadores diagnósticos e prognósticos para hipertrofia e insuficiência cardíaca, e é amplamente utilizado em pesquisas biomédicas para avaliar a resposta hipertrófica em cultura celular ou o desenvolvimento de doenças relacionadas à insuficiência cardíaca em modelos animais.

Dentre os compostos testados, avaliamos o BA5, um derivado do ácido betulínico (BA). O BA é um triterpeno pentacíclico do tipo lupano amplamente distribuído no reino vegetal, sua principal característica é uma potente atividade antitumoral, através da indução de apoptose em células tumorais e tem sido reportado na literatura como agente tripanocida (YIN, 2015). O BA e seus derivados exibem uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas (LEE et al., 2015; SOUSA et al., 2017). Trabalhos demonstraram que o ácido betulínico e seus derivados, como BA5, inibem a proliferação de epimastigotas e reduzem a viabilidade de formas tripomastigotas (DOM; PEN; GIM, 2010; MEIRA et al., 2016). Em nossos achados, o BA5 teve um EC_{50} de 3,2 μ M em hiPSC-CM, valor menor que o fármaco padrão BNZ. Os ensaios realizados em macrófagos apresentaram um valor de EC_{50} de 1,8 μ M (MEIRA et al., 2016). No presente estudo, o BA5, no entanto, apresentou toxicidade, com CC_{50} de 37 μ M, o que é discrepante e significativamente menor que os valores reportados na literatura para macrófagos (MEIRA et al., 2016). Em concentrações mais baixas, foi observada ainda uma diminuição da intensidade de fluorescência da

faloidina, indicando desorganização do citoesqueleto, com EC_{50} de $8,3 \mu\text{M}$ e níveis elevados de NT-pro-BNP, marcador de estresse miocárdico. Além disso, observou-se uma redução concentração-dependente na marcação com MitoTracker após 1 hora de incubação com o composto, sugerindo disfunção mitocondrial, com $EC_{50}=40 \mu\text{M}$. A redução no potencial de membrana mitocondrial está associada à baixa atividade respiratória e produção energética, levando ao aumento na produção de radicais oxidativos, o que pode acarretar em morte celular (VARGA et al., 2015). Após 48 horas, o padrão inverso foi observado, com aumento significativo da intensidade de fluorescência a partir da concentração de $12,5 \mu\text{M}$, o que pode sugerir uma resposta fisiológica com indução de biogênese mitocondrial (XU; DIAZ; BRIEN, 2004). Para confirmação deste resultado, novas análises são necessárias utilizando outras técnicas, como a microscopia eletrônica.

Neste trabalho, também foram avaliados derivados das tiazolidinas, potentes inibidores de cruzaina. A cruzaina é uma enzima expressa nos quatro principais estágios do parasita, principalmente em tripomastigotas e amastigotas, tornando-se assim, um alvo promissor para agentes tripanocidas (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). As tiazolidinas são inibidores potentes da cruzaina e têm sido largamente estudadas como agentes anti-*T. cruzi* (ZALDINI et al., 2010). Foram selecionados dois derivados cíclicos da tiazolidina 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-fenil-5-metiltiazolidin-4-ona e 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-fenil-5-etiltiazolidin-4-ona (GT5A e GT5B), diferenciados pelo grupo metil no GT5A e etilo no GT5B. Ambos têm sido apontados como potentes agentes com ação tripanocida e alto índice de seletividade (BEZERRA et al., 2015). Estes derivados tiveram valores de EC_{50} de $1,9$ e $0,08 \mu\text{M}$, respectivamente, valores muito abaixo comparados ao benzonidazol, que apresentou EC_{50} de $5,9 \mu\text{M}$, sem alterações no número de células e com melhor atividade anti-*T. cruzi in vitro*. Estudos realizados em macrófagos reportam valores de EC_{50} mais elevados, de $4,2$ e $2,9 \mu\text{M}$, respectivamente, para os compostos GT5A e GT5B (BEZERRA et al., 2015). Na avaliação da toxicidade subletal mitocondrial realizada com uma hora de tratamento os compostos não mostraram alterações na intensidade de fluorescência. Já 48 horas ambos tiveram aumento da intensidade de fluorescência que pode ser devido ao aumento da biomassa mitocondrial, possivelmente decorrente do aumento da biogênese mitocondrial. Quanto à organização do citoesqueleto, o GT5A teve

intensidade de fluorescência significativamente reduzida a partir da concentração de 12,5 μM e o GT5B nas concentrações 6,25 μM , 12,5 μM e 50 μM . Anormalidades da estrutura celular têm sido propostas como contribuintes para anormalidades da eletrofisiologia celular e arritmias associadas a fatores agudos isquêmicos ou hemodinâmicos no coração (OJIMA et al., 2000; YANG et al., 2002). Contudo, os compostos não causaram alteração nos níveis de BNP.

A utilização de um ensaio baseado em *High Content Screening*, como o que foi explorado no presente estudo, possui inúmeras vantagens, incluindo o ganho de eficiência, permitindo análise de múltiplos compostos e concentrações. Além disso, a plataforma utilizada permite a realização de análises automáticas, reduzindo vieses e aumentando a confiança no ensaio. Como limitações e perspectivas futuras deste trabalho, buscando uma avaliação mais completa de cardiotoxicidade, será necessária a incorporação de outras análises ao ensaio, incluindo avaliações eletrofisiológicas, estudos de correntes de cálcio utilizando indicadores fluorescentes, análises do padrão de contratilidade e ritmo das células, análise de EROs (ITZHAKI et al., 2011). Por fim, é necessário comparar com outros ensaios de citotoxicidade para validar o processo, e maneiras mais efetivas e baratas para a diferenciação cardíaca.

7 CONCLUSÃO

A utilização de hiPSC-CM no fluxo de trabalho de desenvolvimento de fármacos para a doença de Chagas tem potencial para auxiliar na identificação de novos compostos e pode ser usado para avaliar a cardiotoxicidade de forma preditiva. Neste trabalho estabelecemos o ensaio de infecção e triagem de compostos anti-*T. cruzi* em hiPSC-CM, utilizando análises multiparamétricas em plataforma de *High Content Screening*. Além de possuir a vantagem de ser baseado na utilização de células cardíacas humanas afetadas pela doença de Chagas, o ensaio mostrou-se viável por permitir avaliar rapidamente a ação anti-*T. cruzi* dos compostos, além de parâmetros de cardiotoxicidade letal e subletal, que podem aumentar o valor preditivo dos testes. Novos estudos serão necessários para que este ensaio seja aprimorado e validado quanto ao seu poder preditivo.

REFERÊNCIAS

- EBERT, A. P. LIANG, J. W. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 408–416, 2012.
- ADEMAR, P. *et al.* In vitro trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, n. July, p. 1295–1297, 2011.
- ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. Biochimica et biophysica acta the peptidases of *trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death ☆. **BBA - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 195–206, 2012.
- ANDRADE, L. O. *et al.* Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: An in vitro study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 834–837, 2010.
- BABUIN, L.; JAFFE, A. S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, n. 10, p. 1191–1202, 2005.
- BAHIA, M. T. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–1237, 2014.
- BARBOSA, H. **The role of RCA-binding sites in the adhesion of trypanosoma cruzi to heart muscle cells, as revealed by electron spectroscopic imaging.**, 1993.
- BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BERN, C. Antitrypanosomal therapy for Chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011.
- BEZERRA, G. *et al.* Bioorganic & medicinal chemistry structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 23, p. 7478–7486, 2015.
- BEZERRA, G. *et al.* Design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 141, p. 346–361, 2017.
- BOCCHI, E. A *et al.* Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 95, n. 3, p. 181–9, 2009.
- BOTERO, A. *et al.* In vitro drug susceptibility of two strains of the wildlife trypanosome, *Trypanosoma copemani*: A comparison with *Trypanosoma cruzi*.

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 7, n. 1, p. 34–41, 2017.

BURRIDGE, P. W. *et al.* Production of de novo cardiomyocytes: Human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 16–28, 2012.

BURRIDGE, P. W. *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. **Nature Methods**, v. 11, n. 8, 2014.

BURRIDGE, P. W. *et al.* Human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin–induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**, v. 22, n. 5, p. 547–556, 2016.

CALVET, C. M. *et al.* Trypanosoma cruzi – cardiomyocyte interaction : role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 107, p. 20–30, 2004.

CALVET, C. M. *et al.* Current understanding of the Trypanosoma cruzi – cardiomyocyte interaction. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. October, p. 1–8, 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1909. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

CHAUDHARI, U. *et al.* Identification of genomic biomarkers for anthracycline - induced cardiotoxicity in human iPSC - derived cardiomyocytes : an in vitro repeated exposure toxicity approach for safety assessment. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 11, p. 2763–2777, 2016.

CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. DA C. Diagnóstico parasitológico da doença de chagas Egler Chiari. **Scielo Books**, p. 486, 1997.

CLAYTON, J. Chagas disease : pushing through the pipeline. **Nature**, p. 12–15, jun., 2010.

COHEN, E. D.; TIAN, Y.; MORRISEY, E. E. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. **Development (Cambridge, England)**, v. 135, n. 5, p. 789–798, 2008.

COOPER, J. L. T. Myocarditis. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1526-1538, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Surveillance, health promotion and control of chagas disease in the Amazon Region - medical attention in the Brazilian Amazon Region: A proposal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 7, p. 825–830, 2015.

DOM, D. B.; PEN, L. M.; GIM, A. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. **Phytomedicine Journal**, v. 17, p. 379–382, 2010.

DRAWNEL, F. M. *et al.* Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced report disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. **Cell Reports**, p. 810–820, 2014.

DUARTE, J. G. *et al.* Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates Trypanosoma Cruzi invasion of host cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, 2012.

EBERT, A. D. *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. **Nature**, v. 457, n. 7227, p. 277–280, 2009.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of Trypanosoma cruzi , etiologic agent of Chagas Disease. **SCIENCE**, v. 4975, n. July, p. 409–415, 2005.

FEASTER, T. K. *et al.* Matrigel mattress: a method for the generation of single contracting human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Circulation Research**, p. 995–1000, 2015.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 36, p. 734–747, 2012.

FERREIRA, D. *et al.* Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by Trypanosoma cruzi is mediated by distinct parasite surface molecules. **American Society for Microbiology**, v. 74, n. 10, p. 5522–5528, 2006.

FISCHER, F.; HAMANN, A.; OSIEWACZ, H. D. Mitochondrial quality control : an integrated network of pathways. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 7, p. 284–292, 2012.

FLORES-CHAVEZ, M. D. *et al.* Evaluation of the elecsys chagas assay for detection of Trypanosoma Cruzi -specific antibodies in a multicenter study. **American Society for Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1–14, 2018.

FOR, E. Cardiomyocyte differentiation promotes cell survival during nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibition through increased maintenance of cellular energy stores. **Stem Cell Translational Medicine**, p. 1191–1201, 2017.

GINTANT, G. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. **Nature Publishing Group**, p. 1–15, 2016.

GOLDENBERG, I.; MOSS, A. J.; YORK, N. Long QT Syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 24, 2008.

GRIMM, F. A. *et al.* High-content assay multiplexing for toxicity screening in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and hepatocytes. **Assay Drug Development Technology**, v. 13, n. 9, p. 529–546, 2015.

GROS, L. *et al.* Evaluation of Azasterols as Anti-Parasitics. **American Chemical Society**, p. 6094–6103, 2006.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–123, 2012.

HANNA, J.; HUBEL, A. Pubmed_Result Interaction between disease concepts and the organisation of health care. **European Journal of Cell Biology**, 2009.

HARTMAN, M. E.; DAI, D. F.; LAFLAMME, M. A. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 96, p. 3–17, 2016.

HERRON, T. J. *et al.* Extracellular matrix – mediated maturation of human pluripotent stem cell – derived cardiac monolayer structure and electrophysiological function. **Trends in Pharmacological Sciences**, p. 1–12, 2016.

HORIE, M. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. **Respiration and Circulation**, v. 60, n. 5, p. 483–488, 2012.

ITZHAKI, I. *et al.* Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 225–229, 2011.

KADARI, A. *et al.* Robust generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT signaling. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, n. 4, p. 560–569, 2015.

KARNER, C.; WHARTON, K. A.; CARROLL, T. J. Apical–basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 17, n. 2, p. 214–222, 2006.

LACO, F. *et al.* Unraveling the Inconsistencies of cardiac differentiation efficiency induced by the GSK3 β inhibitor CHIR99021 in human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 10, n. 6, p. 1851–1866, 2018.

LAN, F. *et al.* Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 1, p. 101–113, 2014.

LARA, S. *et al.* Trypanosoma cruzi infection of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an in vitro model for drug screening for Chagas disease. **Microbes and Infection**, 2018.

LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013.

LEE, S. Y. *et al.* Recent studies on betulinic acid and its biological and pharmacological activity. **EXCLI Journal**, n. Table 1, p. 199–203, 2015.

LEONARD, A. *et al.* Afterload promotes maturation of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in engineered heart tissues. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, p. #pagerange#, 2018.

LIAN, X. *et al.* Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. **Nature protocols**, v. 8, n. 1, p. 162–75, 2013.

LIPSHULTZ, S. E. *et al.* Cardiovascular disease in adult survivors of childhood cancer. **Annu Rev Med**, 2015.

LLUIS, F. *et al.* Article Periodic Activation of Wnt / b -Catenin Signaling Enhances Somatic Cell Reprogramming Mediated by Cell Fusion. **Stem Cell**, v. 3, n. 5, p. 493–507, 2008.

LONGO, D. L.; BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

LYU, Y. L. *et al.* Topoisomerase II B – Mediated DNA Double-Strand Breaks : Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. **Cancer Research**, n. 18, p. 8839–8847, 2007.

MA, J. *et al.* High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes : electrophysiological properties of action potentials and ionic currents High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes : electrophysiological properties of ac. **American Journal of Physiology**, 2011.

MACHADO, F. S. *et al.* Trypanosoma cruzi – infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide – dependent trypanocidal activity. **Circulation**, p. 3003–3009, 2000.

MANDAVIA, C. H. *et al.* Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. **Life Sciences**, p. 1–8, 2012.

MANQUE, P. A. *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **American Society for Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1855–1862, 2011.

MARON, B. J.; MARON, M. S. Hypertrophic cardiomyopathy. **The Lancet**, v. 6736, n. 12, 2012.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MEIRA, C. S. *et al.* Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti- *Trypanosoma cruzi* inhibitors. **Experimental Parasitology journal**, v. 166, p. 108–115, 2016.

MELLO, D. A. Crescimento e diferenciação “in vitro” de cepas de *Trypanosoma cruzi*, isolada de animais silvestres. **Revista de Saude Publica**, v. 14, n. 4, p. 569–581, 1980.

MERCOLA, M.; COLAS, A.; WILLEMS, E. Induced pluripotent stem cells in cardiovascular drug discovery. **Circulation Research**, v. 112, n. 3, p. 534–548, 2013.

MINAMI, I. *et al.* A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1448–1460, 2012.

MIOULANE, M.; FOLDES, G.; ALI, N. N. Development of high content imaging methods for cell death detection in human pluripotent stem. **Journal of Cardiovascular Transactions**, p. 593–604, 2012.

MOREIRA, D. R. M. *et al.* Structural design , synthesis and structure – activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti- *Trypanosoma cruzi* activity. **ChemMedChem**, p. 1–13, 2013.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Utilizes the Host Low Density Lipoprotein Receptor in Invasion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, 2011.

NAITO, A. T. *et al.* Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 52, p. 19812–19817, 2006.

NARSINH, K.; NARSINH, K. H.; WU, J. C. Derivation of human induced pluripotent stem cells for cardiovascular disease modeling. **Circulation Research**, v. 108, n. 9, p. 1146–1156, 2011.

OJIMA, K. *et al.* Distinct families of z-line targeting modules in the COOH-terminal region of nebulin. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 3, p. 553–566, 2000.

OLSON, E. N.; SCHNEIDER, M. D. Sizing up the heart: Development redux in disease. **Genes and Development**, v. 17, n. 16, p. 1937–1956, 2003.

PAULI, I. Molecular modeling and structure–activity relationships for a series of benzimidazole derivatives as cruzain inhibitors. **Medicinal Chemistry**, 2017.

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for Interleukin-1 α in *Trypanosoma cruzi* - Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. **American Society for Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4441–4447, 2003.

- RODRIGO, D. *et al.* In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine journal**, p. 3–8, 2015.
- RODRÍGUES-POVEDA, C. A. *et al.* 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids are potent inhibitors of the enzymatic activity of *Trypanosoma cruzi* squalene synthase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4483–4486, 2012.
- ROMANHA, A. J. **ChemMedChem**, In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 233–238, mar. 2010.
- SAHA, K.; JAENISCH, R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 6, p. 584–595, 2009.
- SALA, L. Integrating cardiomyocytes from human pluripotent stem cells in safety pharmacology : has the time come ? **British Journal of Pharmacology**, p. 3749–3765, 2017.
- SANCHEZ-FREIRE, V. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease specific patterns of cardiotoxicity. **Circulation**, v. 127, n. 16, 2014.
- SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1239–1259, 2002.
- SHARMA, A. Human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes as an in vitro model for coxsackievirus B3–induced myocarditis and antiviral drug screening platform. **Circulation Research**, 2014.
- SHI, W. *et al.* Mitochondria-targeting small molecules effectively. **Moleculares**, p. 1–19, 2018.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.
- SINNECKER, D.; LAUGWITZ, K.; MORETTI, A. Pharmacology & Therapeutics Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug development and toxicity testing. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 143, n. 2, p. 246–252, 2014.
- SIRENKO, O. *et al.* In vitro cardiotoxicity assessment of environmental chemicals using an organotypic human induced pluripotent stem cell-derived model. **Toxicology Applied Pharmacology**, p. 60–74, 2018.
- SISHI, B. J. N. **ChemMedChem**, Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. **Experimental Biology and Medicine**, n. 1, p. 219–226, 2012.

- SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L. The pathogenesis of Chagas ' disease : when autoimmune and parasite-specific immune responses meet *. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, 2001.
- SOARES, M. J.; SOUTO-PADRIN, T.; SOUZA, W. D. E. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 167, p. 157–167, 1992.
- SOEIRO, M. DE N. C.; CASTRO, S. L. de. Screening of Potential anti-*Trypanosoma cruzi* Candidates: In Vitro and In Vivo Studies. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 21–30, 2011.
- SOEIRO, M. N. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. **Cell Structure and Function**, 1999.
- SOUSA, M. C. *et al.* Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives : synergistic effects with miltefosine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–12, 2014.
- SOUSA, P. L. *et al.* Acta Tropica Betulinic acid induces cell death by necrosis in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 174, p. 72–75, nov. 2017.
- SPIVAK, A. Y. *et al.* Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulinic acid against *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2014.
- SURENDRAN, S.; SIVAMURTHY, G. Current Applications and Future Prospects of Stem Cells in Dentistry. **Dental Update**, v. 42, n. 6, p. 556–8, 560–1, 2015.
- TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–76, 25 ago. 2006.
- TALBERT, D. R. *et al.* A Multi-parameter in vitro screen in human stem cell-derived cardiomyocytes identifies ponatinib- induced structural and functional cardiac toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 143, n. 1, p. 147–155, 2015.
- TODOROV, A. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor subtypes (B1/B2). **The FASEB Journal**, 2002.
- URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.

VARGA, Z. V *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Interplay of oxidative , nitrosative / nitrative stress , in inflammation , cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy ☆ Hyperglycemia Tissue injury Diabetic cardiomyopathy. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 2, p. 232–242, 2015a.

VARGA, Z. V *et al.* Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, n. 2004, 2015b.

WEINKAUF, C.; SALVADOR, R.; PEREIRAPERRIN, M. Neurotrophin receptor TrkC Is an entry receptor for Trypanosoma cruzi in neural , glial , and epithelial cells □. **American Society for Microbiology**, v. 79, n. 10, p. 4081–4087, 2011.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, p. 191, 2015.

WILLERT, K.; JONES, K. A. Wnt signaling: is the party in the nucleus? **Genes & development**, v. 20, n. 11, p. 1394–404, 1 jun. 2006.

XU, J. J.; DIAZ, D.; BRIEN, P. J. O. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 115–128, 2004.

YANG, X. *et al.* Cytoskeletal actin microfilaments and the transient outward potassium current in hypertrophied rat ventriculocytes. **Journal of Physiology**, p. 411–421, 2002.

YANG, X.; PABON, L.; MURRY, C. E. Engineering Adolescence. p. 549–561, 2014.

YIN, M. Review article Inhibitory effects and actions of pentacyclic triterpenes upon glycation. **BioMedicine**, v. 5, n. 3, p. 1–8, 2015.

YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic Acid and Its Derivatives : A Review on their Biological Properties. **Current Medicinal Chemistry**, p. 657–666, 2005.

ZALDINI, M. *et al.* Bioorganic & medicinal chemistry studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7826–7835, 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Expandable cardiovascular progenitor cells reprogrammed from fibroblasts. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 368–381, 2016.

ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista de Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.