

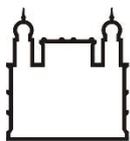
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Análise de possíveis eventos adversos do uso de sangue autólogo em
modelos murino e seu potencial impacto sobre o curso da infecção
experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

BEATRIZ PHILOT PAVÃO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BEATRIZ PHILOT PAVÃO

Análise de possíveis eventos adversos do uso de sangue autólogo em modelos murino e seu potencial impacto sobre o curso da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P337 Pavão, Beatriz Philot

Análise de possíveis eventos adversos do uso de sangue autólogo em modelos murino e seu potencial impacto sobre o curso da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* / Beatriz Philot Pavão. – Rio de Janeiro, 2017.

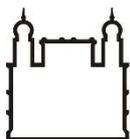
xviii, 91 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Bibliografia: f. 74-88

1. Inflamação. 2. Modelos experimentais. 3. Ensaio pré-clínico. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BEATRIZ PHILOT PAVÃO

Análise de possíveis eventos adversos do uso de sangue autólogo em modelos murino e seu potencial impacto sobre o curso da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

ORIENTADORA:

Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro

Aprovada em: 22/02/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Helene Santos Barbosa (IOC/Fiocruz) – Presidente/Revisora

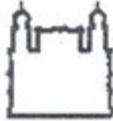
Prof. Dra. Solange Lisboa de Castro (IOC/Fiocruz) - Membro

Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas (UFRJ) - Membro

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (UERJ) - Suplente

Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira (IOC/Fiocruz) - Suplente

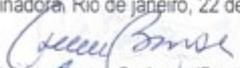
Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2017



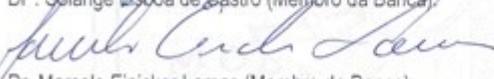
Ministério da Saúde

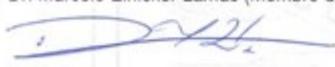
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Beatriz Philot Pavão**, sob orientação da Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro. Ao vigésimo segundo dia do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Carlos Chagas/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"Análise de possíveis efeitos adversos do uso de sangue autólogo em modelos murino e seu potencial impacto sobre o curso da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Helene Santos Barbosa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Solange Lisboa de Castro - IOC/FIOCRUZ, Dr. Marcelo Einicker Lamas - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Otacilio da Cruz Moreira - IOC/FIOCRUZ e Dr. Israel Felzenszwalb – UERJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVADA da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2017.


Dr^a. Helene Santos Barbosa (Presidente da Banca):


Dr^a. Solange Lisboa de Castro (Membro da Banca):


Dr. Marcelo Einicker Lamas (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram presentes em minha trajetória acadêmica, incentivando-me e apoiando-me para a realização de mais este sonho.

Agradecimentos

A Deus, por guiar meus caminhos e me dar sabedoria, força e coragem para seguir em frente.

A minha querida orientadora, Dra. Maria de Nazaré Soeiro, pela qual tenho grande admiração e carinho. Obrigada pela acolhida, apoio, amizade e pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

As Dra. Cristiane França e Denise Gama, além dos técnicos Marcos Meuser e Patrícia Bernardino, que desde o início me auxiliaram com paciência e dedicação no desenvolvimento dos experimentos, meu profundo agradecimento e carinho.

A Me. Kelly Demarque, pela sua disponibilidade, atenção e carinho ao ensinar, assim como pelas valiosas conversas que muito me acrescentaram, além da minha formação acadêmica. E ao Dr. Gabriel Melo, Dr. Marcello Barcinski, Dra. Cynthia Cascabulho e Me. Luzia Caputo pelos ensinamentos e colaborações essenciais durante a execução do meu projeto.

Aos queridos amigos de laboratório, Magna Guedes, Julianna Siciliano, Mariannne Rocha, Aline Nefertiti, Camila Santos, Carlos Oliveira, Raiza Brandão, Ludmila Fiuza, Rayane Nogueira, Renata Motta, João Soares e Ivana Melo pela troca de conhecimentos, auxílios na bancada e momentos de descontração.

Aos meus pais, Edson e Cristine, pelo amor incondicional, orações e por sempre estarem presentes me proporcionando todas as ferramentas para a conclusão de mais essa etapa.

As minhas irmãs Carine e Daniele, pelo companheirismo, amor e amizade de sempre.

Aos meus avós Sidney e Ieda, e a todos os meus familiares que sempre torceram pelas minhas conquistas.

Ao Marcos Vinicius, pela doce convivência, paciência e incentivo que tornaram esta caminhada mais leve.

Finalmente, ao programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, bem como seus professores, às agências financiadoras deste trabalho, e a todos que de maneira indireta contribuíram para seu andamento e conclusão.

Esta dissertação foi desenvolvida sob orientação da Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, e teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), PAEF/CNPq/Fiocruz e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Data da matrícula no Programa de Mestrado em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz: Março de 2015

RESUMO

O uso de sangue autólogo (SA) representa uma prática médica alternativa/complementar empregada em diversas propostas, incluindo terapia médica e veterinária contra infecções, patologias crônicas e neoplasias. Uma das técnicas de aplicação desta prática é a administração intramuscular do sangue imediatamente após sua coleta, sendo esta considerada ilegal no Brasil, devido à escassez de dados científicos relacionados à sua segurança e eficácia. Assim, nosso objetivo é investigar possíveis eventos adversos do uso de SA em modelos murino saudáveis e seu potencial impacto no curso da infecção experimental aguda pelo *Trypanosoma cruzi*. O primeiro bloco de estudos consistiu na injeção de SA e salina (SAL) na região posterior do músculo quadríceps de camundongos Swiss Webster machos saudáveis em esquemas terapêuticos distintos, avaliando: comportamento animal, peso corpóreo e de órgãos, hemograma, análise bioquímica plasmática e histológica para dano tecidual, assim como perfil plasmático de citocinas inflamatórias. Observamos ausência de efeitos adversos frente aplicação de SA, exceto na alteração da marcha (20-40%) dos animais que receberam três doses de 20 µL de SA no mesmo membro. O uso de SA e SAL desencadeou imediata resposta polimorfonuclear (até 24 h) seguida por infiltrado mononuclear (48h - 168 h). Porém, apesar de SAL ter deflagrado uma resposta inflamatória (possivelmente por estresse mecânico induzido pela própria agulha e volume injetado), a cinética e intensidade do perfil histológico e dos níveis de mediadores humorais diferiram, ocorrendo de forma mais precoce e intensa, concomitante elevação de IL-6 quando utilizamos SA. SAL induziu um pico inflamatório mais tardio com predominância de células mononucleares (48 - 168 h) e aumento de IL-10 em 24 h. No segundo bloco foi investigado se SA seria capaz de impactar no curso de uma patologia parasitária utilizando como modelo a infecção aguda em murinos causada pelo *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Os ensaios exploraram diferentes esquemas (pré-infecção e pós-infecção) e períodos de administração de SA (1 a 10 dias). Investigamos o impacto do uso de sangue heterólogo (SH), avaliando o perfil de citocinas em animais tratados e não tratados. Independentemente do esquema de estudo, ligeiros decréscimos (<30%) nos níveis de parasitemia foram encontrados com uso de SA, enquanto a droga de referência (Benznidazole-Bz) suprimiu a carga parasitária. A terapia com SA e SH antes e após a infecção não protegeu contra a mortalidade enquanto o Bz (pós-infecção) (100mg/kg) conferiu 100% de sobrevivência. Um aumento de IFN-gama, TNF-alfa e IL-6 foi detectado no 9º dpi nos animais infectados, porém apenas o uso de Bz reduziu significativamente os níveis ($p = 0,02$) de TNF-alfa em relação ao grupo infectado e não tratado. Nossos dados não suportam evidências do efeito protetor de SA sobre infecção experimental causada pelo protozoário intracelular *T. cruzi* e estudos adicionais em diferentes condições patológicas, incluindo infecções causadas por outros parasitos, é de relevância para uma melhor compreensão do efetivo impacto deste procedimento, como abordagem terapêutica complementar.

ABSTRACT

Autologous whole blood (AWB) is claimed as alternative/complementary medical practice which has been largely employed on several proposals including medical and veterinary therapy against infections, chronic pathologies and neoplasias. One of the technical application of this practice consists by the intramuscular administration of the blood immediately after its collection. This is considered illegal in Brazil, due to the lack of scientific data related to its safety and efficacy. In this context, our aim is to investigate the *in vivo* biological effect of AWB using healthy murine models and under the course of a parasitic infection using a model of acute infection by *Trypanosoma cruzi*. The first group of studies consisted of injecting different volumes of AWB and saline (SAL) at the posterior region of quadriceps muscle of Swiss male healthy mice under distinct therapeutic schemes and thus were evaluated: animal behavior, body and organ weight, hemogram, plasmatic biochemical analysis for tissue damage as well as inflammatory cytokine levels and profile. No major adverse events were noticed in AWB administration, except gait impairment in animals (20-40%) that received three doses of 20 μ L AWB at the same hind limb. AWB and SAL triggered an immediate polymorphonuclear response (up to 24 h) followed by a mononuclear infiltrate (48-168 h). However, we observed that although SAL was able to trigger an inflammatory response (probably due to the mechanical stress induced by the needle itself and injected volume), the kinetics and intensity of the histological profile and the levels of humoral mediators were different from the AWB use, occurring in a earlier and more intense manner concomitant with elevation of plasma IL-6 when AWB was used. SAL induced a later inflammatory peak response composed mostly by mononuclear cells (48-168 h) with IL-10 increase at 24 h. One week post treatment, no tissue alteration could be found. In the second block of studies, it was investigated if AWB could impact the course of an experimental parasitic pathology using an acute mouse model of *T. cruzi* infection, the etiological agent of Chagas disease. The assays explored different schemes (prior and post infection) and periods of AWB administration (from one up to 10 days), also employing heterologous blood (HWB) and evaluating plasma cytokine profile in untreated and treated animals. Regardless the studied scheme, only minor decreases (<30%) in the parasitemia levels could be found when AWB was administered while the reference drug (benznidazole-Bz) suppressed parasite load. AWB and HWB given before and after infection did not protect against mortality while Bz (after infection) gave 100% animal survival. A rise in IFN-gama, TNF-alpha and IL6 was found at 9 day post infection in all infected animals as compared to uninfected mice but only Bz-treated group displayed statistically significant lower ($p = 0.02$) TNF-alpha levels than infected and untreated mice. Our data do not support evidences of AWB effect towards experimental mouse model of intracellular protozoan infection like *T. cruzi*. Further *in vivo* studies in different pathological conditions, including infections caused by other parasites, are relevant for a better understanding of the effective impact of this procedure as a complementary therapeutic approach.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Terapias alternativas e complementares.....	15
1.1.1 Uso de sangue autólogo.....	16
1.2 Resposta imune.....	20
1.3 Doença de Chagas: considerações gerais.....	23
1.3.1 Aspectos clínicos e patogênese da doença.....	24
1.3.2 Transmissão.....	25
1.3.3 Formas evolutivas e ciclo de vida.....	26
1.3.4 Diagnóstico.....	27
1.3.5 Terapia.....	28
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Primeiro bloco de estudos: análises em animais sadios.....	33
4.1.1 Esquemas de tratamento.....	33
4.1.2 Análises de hemograma completo e bioquímica.....	35
4.1.3 Análises comportamentais.....	35
4.1.4 Análises histológicas.....	36
4.1.5 Peso corpóreo e de órgãos e taxas de sobrevivência.....	36
4.1.6 Análise do perfil de citocinas por citometria de fluxo.....	37
4.2 Segundo bloco de estudos: análises em animais infectados experimentalmente pelo <i>T.cruzi</i>.....	37

4.2.1	Solução stock de benznidazole.....	37
4.2.2	Parasitos.....	37
4.2.3	Infecção.....	38
4.2.4	Esquema de tratamento.....	38
4.2.5	Parasitemia, peso corpóreo e taxas de mortalidade.....	39
4.2.6	Análise do perfil de citocinas por citometria de fluxo.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Primeiro bloco de estudos: análises em animais sadios.....	41
5.1.1	Ensaio com três administrações (Esquema 1).....	41
5.1.2	Ensaio de administração única (análise de 0, 2, 24, 48, 72 e 168 horas – Esquema 2).....	49
5.2	Segundo bloco de estudos: análises em animais experimentalmente infectados pelo <i>T. cruzi</i>.....	54
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÕES.....	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9	ANEXOS.....	89
	ANEXO A - PRÊMIOS E TÍTULOS.....	89
	ANEXO B - ARTIGOS PUBLICADOS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Achados clínicos da fase crônica da doença de Chagas
- Figura 2: Esquema ilustrativo do ciclo de vida do *T. cruzi*
- Figura 3: Esquemas de tratamento nos modelos experimentais murino sadios
- Figura 4: Esquemas de tratamento nos modelos experimentais murino sadios
- Figura 5: Avaliação comportamental (atividades exploratória e motora)
- Figura 6: Análise histopatológica da presença de infiltrado inflamatório
- Figura 7: Análise de leucograma e perfil inflamatório tecidual e plasmático
- Figura 8: Análise histopatológica da presença de infiltrado inflamatório
- Figura 9: Análise histopatológica da presença de eosinófilos
- Figura 10: Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa
- Figura 11: Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa
- Figura 12: Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa
- Figura 13: Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa
- Figura 14: Análise do perfil de citocinas plasmáticas
- Figura 15: Análise do perfil de citocinas plasmáticas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de hemograma

Tabela 2: Análise bioquímica de marcadores de lesão tecidual

Tabela 3: Análise da presença de células inflamatórias (número de células inflamatórias por campo) e grau de lesão tecidual

Tabela 4: Perfis de citocinas plasmáticas

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase
AST: aspartato aminotransferase
bFGF: fator de crescimento de fibroblasto básico
Bz: benznidazole
CK: creatina quinase
DC: doença de Chagas
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dpi: dias pós infecção
EGF: fator de crescimento epidermal
HCT: hematócrito
HGB: hemoglobina
HGF: fator de crescimento de hepatócitos
IFN: interferon
IL: interleucina
ia: intra-arterial
im: intramuscular
iv: intravenosa
IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina
IgG: imunoglobulina
LAFEPE: Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
L-PRP: plasma rico em leucócitos e plaquetas
MCH: média corpuscular de hemoglobina
MCHC: média da concentração corpuscular de hemoglobina
MCV: volume corpuscular médio
MIP-1: proteínas inflamatórias de macrófago
nd: não determinado
Nf: Nifurtimox
NK: *natural killer*

PCR: Reação em cadeia da polimerase
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PMACs: práticas médicas alternativas e complementares
PRP: plasma rico em plaquetas
P-PRF: fibrina rica em plaquetas pura
PRGF: plasma rico em fatores de crescimento
RBC: eritrócitos
SA: sangue autólogo
SAL: salina
sc: subcutânea
SH: sangue heterólogo
SRE: sistema retículo endotelial
TGF- β : fator de transformação do crescimento beta
TNF: fator de necrose tumoral
TS: tripomastigotas sanguíneos
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial
WBC: leucócitos

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapias alternativas e complementares

As práticas médicas alternativas e complementares (PMACs) compreendem um conjunto de sistemas, práticas e produtos utilizados em unidades assistenciais em saúde (ou mesmo fora delas) e que não fazem parte da própria tradição do país e/ou não estão integrados formalmente em seu sistema de saúde (WHO, 2000). Enquanto a medicina alternativa substitui o uso de procedimentos da clínica convencional e/ou tradicional, a medicina complementar é utilizada adicionalmente a outros tratamentos. Estas incluem uma vasta gama de intervenções, tais como, a eletroterapia (Ren et al., 2001; Cabrales et al., 2001), ayurveda (Niemi e Stahle, 2016), “biofeedback” (Corral et al., 2015), hipnose (Ardigo et al., 2016), dietas especiais (como a vegetariana e macrobiótica) (Lerman, 2010), Yoga (Scroggins et al., 2016), “Reiki” (Notte et al., 2016), auto-hemoterapia (Moura, 2006; Raeissadat et al., 2014), dentre outras (Uemura et al., 1997; Stokley et al., 2008). Apesar do uso das PMACs por milhares de indivíduos em países de diferentes continentes para o tratamento de variadas patologias, não há adesão por grande parte dos profissionais de saúde em sugerir estes tratamentos, devido ao insuficiente embasamento científico que comprove sua eficácia e segurança (Barnes et al., 2008).

Fatores socioeconômicos e culturais, dentre outros, apresentam influência sobre o uso dos diferentes recursos terapêuticos tradicionais. A falta de recursos e o limitado acesso aos serviços médicos interferem diretamente no uso de terapias “populares” e mesmo acesso a indivíduos sem formação da área de saúde (ex. curandeiros, xamãs, entre outros) visando tratamento de patologias, muitas vezes de natureza grave o que pode reduzir as chances de cura, remissão clínica e mesmo resultar em risco de morte do paciente (Chibwana et al., 2009). Por outro lado, em vários países (incluindo os chamados desenvolvidos), um número substancial de terapias alternativas e complementares tem sido empregadas na prevenção de doenças e propostas de promoção da saúde, desde que previamente comprovadas quanto ao teor

científico (Eisenberg et al., 1998). Desta forma, devido ao seu baixo custo, o uso das PMACs, quando avaliadas por rigorosos estudos pré-clínicos e clínicos, podem contribuir para identificação de um novo arsenal terapêutico complementar para uso em patologias, incluindo as doenças negligenciadas que afetam populações em áreas de extrema pobreza.

1.1.1 Uso de sangue autólogo

O uso de sangue autólogo (SA), também conhecido como auto-hemoterapia, soroterapia, imunoterapia ou autohemotransfusão foi introduzido por Ravaut, em 1910 (Leite et al., 2008). Desde então, tem sido descrito como procedimento médico (Ross et al., 1947; Olwin et al., 1997) e veterinário (Veríssimo e Katiki, 2007; Bezerra de Melo et al., 2010) para terapia de diferentes agravos de origem infecciosa, auto-imune e neoplásica (Olwin et al., 1997; Moura, 2006). Diferentes modalidades de SA são empregadas utilizando distintas rotas de administração em especial: intravenosa (iv), intra-articular (iar), intramuscular (im), subcutânea (sc), intra-arterial (ia), e também pela incubação prévia com ozônio (Bocci, 1994; Wu et al., 2013; Tsuzuki et al., 2016). Dentre suas variações de uso, a mais frequente se relaciona a coleta de sangue venoso (5-20 mL), a partir da região antecubital do braço, para imediata aplicação intramuscular no músculo deltóide e/ou glúteo. Com relação aos mecanismos de ação, ainda existe uma importante lacuna nesta área, mas alguns mecanismos têm sido propostos, incluindo (i) estimulação do sistema microcirculatório; (ii) aumento dos níveis de oxigenação de tecidos isquêmicos; (iii) estimulação da via glicolítica de eritrócitos; (iv) reposta imune do hospedeiro (v) modulação do balanço oxidativo. Estes possíveis mecanismos de ação estão relacionados ao tipo de procedimento realizado (por ex. com ou sem ozônio), ao volume administrado (“minor” – 5-20 mL ou “major” – 200-400 mL), a rota de administração (iv, im, sc, etc.) e a natureza da doença a ser tratada (Bocci, 1994; Moura, 2006; Foglieni et al., 2011; Borrelli et al., 2012; Sandrey, 2014).

Um dos primeiros relatos da literatura de uso de sangue autólogo atribuía seus efeitos benéficos à ativação do sistema retículo endotelial (SRE)

(Schurer-Waldheim, 1933), que consiste em um conjunto de células localizadas em diferentes tecidos, especialmente na medula óssea, fígado, baço, linfonodos e timo, dotadas da capacidade fagocítica, atuando ainda no armazenamento de ferro e determinados produtos metabólicos. Neste estudo (Schurer-Waldheim, 1993), por meio do corante Vermelho Congo, o autor relatou o aumento na capacidade dos fagócitos em armazenar pigmentos frente à administração de sangue autólogo: o uso de uma substância irritante (a cantárida) sobre a pele da coxa de pacientes por 24 h, levou à formação de uma pequena bolha cujo conteúdo foi extraído, centrifugado e então corado para contagem diferencial de leucócitos. Os resultados a partir desta quantificação, revelaram que com o uso da auto-hemoterapia, após o período de 8 horas, o percentual de monócitos foi elevado de 5 para 22%, decrescendo gradualmente e atingindo seus valores iniciais 7 dias após a administração (Schurer-Waldheim, 1933).

Após observação empírica de resultados positivos alcançados com o uso de sangue autólogo para o tratamento de pneumonias pós-operatórias, Mettenleiter (1936) descreve a administração profilática de 20 mL de sangue pela via intramuscular em 300 pacientes logo após procedimentos cirúrgicos. O autor descreve ausência de complicações pulmonares, exceto um paciente que apresentou trombose pulmonar cinco dias após a cirurgia. Visando também contribuir para redução de complicações pulmonares pós-operatórias, em 1940, o Dr. Jesse Teixeira relatou as observações da administração de sangue autólogo em um pronto-socorro na cidade do Rio de Janeiro, no qual as cirurgias de urgência (por não fazerem uso de cuidados pré-operatórios) exibiam altas taxas de complicações pulmonares. Dos 150 casos com aplicação da auto-hemoterapia, nenhum resultou em complicações infecciosas pós-cirúrgicas, diferentemente dos dados em pacientes nos quais este procedimento não foi conduzido. Em sua publicação, o autor sugere que ao entrar em contato com a seringa (“um corpo estranho”), o sangue sofreria alterações físico-químicas e que quando administrado novamente no indivíduo doador, poderia ser reconhecido pela resposta imune como “elemento exógeno”. Além disso, em concordância com as observações de Mettenleiter, o sangue autólogo apresentaria propriedades estimulantes sobre o sistema

simpático e o parassimpático que atuam sobre ações vasomotoras e teciduais em todo o organismo (Teixeira, 1940).

Análises experimentais e clínicas avaliaram o efeito do uso de SA em humanos e animais portadores de diferentes doenças infecciosas. Olwin e colaboradores (1997) relataram que em pacientes com diferentes tipos de herpes e que foram submetidos à administração im de 10 mL de sangue, houve alívio completo da dor e desaparecimento das lesões (Olwin et al., 1997). Outra modalidade da terapia de SA consiste na incubação prévia das amostras de sangue com ozônio, devido às propriedades microbicidas contidas neste elemento. Esta técnica foi empregada no tratamento de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, na qual foi realizada a mistura de 150 mL (“major”) ou 3-5 mL (“minor”) de sangue com ozônio/oxigênio para posterior aplicação intravenosa, sendo realizada 3 vezes por semana. A terapia com ozônio foi capaz de promover a melhora dos sintomas clínicos associado à hepatite C crônica, normalizando os níveis dos marcadores de lesão hepática e, além disso, uma redução da viremia em 25-45% (Zaky et al., 2011).

Um estudo envolvendo a comparação de diferentes tratamentos para a papilomatose cutânea, em bovinos leiteiros, revelou sucesso terapêutico em 50% no grupo de animais tratados com SA, demonstrando melhora significativa quando comparado ao não tratado (Santin e Brito, 2004). Além disso, este procedimento também foi empregado em um caso de papilomatose oral canina (Bambo et al., 2012), no qual 20 mL de sangue foram coletados da veia jugular para administração na base dos papilomas e áreas circundantes, em um volume que variou de 0,5 a 1 mL. Observou-se completa remissão dos papilomas após 5 aplicações, não havendo indícios de recidiva após o período de 6 meses (Bambo et al., 2012). Ainda na esfera veterinária, o tratamento com SA foi utilizado em casos de ectima contagioso em um rebanho ovino em comparação com a terapia convencional. No grupo de ovelhas submetidas ao uso de 5 mL de SA por via im (uma administração a cada 48 h), obteve-se cura com regressão total das lesões em 14,3% após uma semana e de 85,7% na segunda semana (Veríssimo e Katiki, 2007).

Na literatura constam estudos sobre o papel imunomodulador do grupo heme, liberado na degradação eritrocitária em situações de hemólise ou

hemorragia, atuando como fator quimioatraente na migração de neutrófilos e geração de espécies reativas de oxigênio (Graça-Souza et al., 2002; Porto et al., 2007). Ainda neste contexto, diversos trabalhos tem demonstrado o potencial terapêutico envolvido com uma fração celular do sangue, as plaquetas, cujos grânulos-alfa armazenam uma gama de fatores de crescimento, como: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de transformação do crescimento beta-1 (TGF- β 1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF). Além disso, armazenam ainda citocinas e quimiocinas como a interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-12 (IL-12), proteínas inflamatórias de macrófago (MIP-1) e RANTES (CCL5) (Mejia e Bradley, 2011; Mussano et al., 2016). Estas moléculas em conjunto orquestram processos de reparo tecidual que envolvem a destruição/inflamação, regeneração/reparo e fibrose/remodelamento. As plaquetas também possuem grânulos densos, que abrigam distintos elementos bioativos que participam da regulação das diferentes fases do reparo tecidual, como a adenosina, serotonina, histamina, cálcio e catecolaminas (Mejia e Bradley, 2011; Mussano et al., 2016). Frente a estas propriedades, o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido amplamente utilizado em diferentes áreas médicas, como na odontologia (Mendonça et al., 2008; Magesh et al., 2013), ortopedia (Filardo et al., 2011; Fader et al., 2015) oftalmologia (Arnalich et al., 2016) e dermatologia (Suresh et al., 2014; Ulusal et al., 2016). Diferentes protocolos e modalidades tem sido empregados, como por exemplo, plasma rico em leucócitos e plaquetas (L-PRP), fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF), plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) ou PRP pobre em leucócitos (Dohan et al., 2014).

Com relação aos riscos e efeitos adversos em especial pela administração por leigos, o uso de sangue autólogo pode resultar em agressão aos nervos e vasos, induzindo necrose tecidual, hematomas e dor (Cassiani e Rangel, 1999; You et al., 2015). No entanto, em estudo epidemiológico e molecular feito em Roma durante um surto de infecção de hepatite C, relacionou-se a infecção dos pacientes a terapia de sangue autólogo

enriquecido com ozônio (Faustini et al., 2005). Sendo assim, a realização dos procedimentos por um profissional qualificado, que possua conhecimento técnico e científico acerca destes, pode resultar na minimização ou anulação destas ocorrências (Cassiani e Rangel, 1999).

Apesar do uso em diversos países da Europa e do grande número de indivíduos que realiza de modo informal esta prática no Brasil, este procedimento não é reconhecido e foi banido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2007. Está enquadrado no inciso V, Art. 2º do Decreto 77.052/76, constituindo infração sanitária, estando sujeito às penalidades previstas no item XXIX, do artigo 10, da Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977. A principal questão considerada é o argumento de que ainda não há embasamento científico que comprove a eficácia e segurança do procedimento (ANVISA, 2007; Leite et al., 2008).

1.2 Resposta imune

O processo inflamatório consiste em uma resposta fisiológica homeostática do organismo exposto à lesões de diferentes origens (mecânica, térmica, química ou física), agentes infecciosos, e até mesmo na ocorrência de reações autoimunes (Ringler, 2000; Tedgui e Mallat, 2001; Rottem e Mekori, 2005). Este processo possui como papel fundamental a remoção de seu estímulo indutor e reparo do tecido afetado (Gruys et al., 2006; Abbas et al., 2012). A resposta inflamatória pode ser aguda ou crônica. A aguda tem início imediatamente após o dano e é de duração relativamente curta, envolvendo uma resposta local com eventos de coagulação, produção de cininas, vasodilatação e migração de leucócitos (predominantemente neutrófilos). Além disso, na fase aguda, também estão presentes alterações sistêmicas, que incluem a febre, aumento nos níveis plasmáticos de proteínas sintetizadas por hepatócitos e leucocitose (Bauhman e Gauldie, 1994; Eckersall e Bell, 2010). Por outro lado, a resposta crônica possui maior duração e ocorre quando há persistência do estímulo agressor, sendo caracterizada pela presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e fibrose (Gallin et al., 1999; Abbas et al., 2012).

A liberação de uma vasta gama de mediadores químicos derivados de células residentes no sítio de agressão, como mastócitos, macrófagos e células endoteliais irão orquestrar os eventos inflamatórios vasculares e celulares (Gruys et al., 2006; Abbas, 2012). Inicialmente, ocorre a vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar pela ação de moléculas aminas vasoativas (como a histamina e serotonina) liberadas por macrófagos e mastócitos ativados logo após a infecção/agressão (Ringler, 2000; Gruys et al., 2005; Cruvinel et al., 2010). Essa resposta imediata provoca o extravasamento de fluidos (exsudato e transudato) que contém diversos mediadores e componentes dos quatro sistemas enzimáticos: cascata da coagulação, sistema das cininas, sistema fibrinolítico e cascata do complemento (Ringler, 2000; Robbins e Cotran, 2005).

A ativação e recrutamento de leucócitos em direção ao foco inflamatório se dão a partir de elementos quimiotáticos que levam a sua marginação próxima a parede capilar, na qual através da diminuição do fluxo sanguíneo promovido pela vasodilatação irá permitir que ocorra sua interação com o endotélio. Moléculas de adesão como as selectinas conferem uma aderência frouxa dos leucócitos com o endotélio durante o processo de rolamento, enquanto a ação das integrinas envolve a aderência necessária para que ocorra a transmigração das células para o tecido adjacente (Ringler, 2000; Abbas et al., 2012).

Dentre o diverso repertório de mediadores inflamatórios que atua no desenvolvimento da inflamação encontram-se as prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, bradicinina, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, ATP, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, existem diferentes grupos de citocinas que compreendem as interleucinas (ILs), interferons (IFNs), quimiocinas, fatores estimuladores de colônias (CSFs), fator de crescimento transformante beta (TGF β) e os fatores de necrose tumoral (TNFs). Durante a resposta imune inata destacam-se três importantes citocinas pró-inflamatórias que são produzidas principalmente por macrófagos e mastócitos: TNF, IL-1 e IL-6, que em conjunto com as demais moléculas secretadas nos locais de infecção/lesão, atuam sobre as células endoteliais vasculares, leucócitos e a medula óssea (Ruslan, 2008; Abbas et

al., 2012). As primeiras células a chegarem no sítio de agressão são os polimorfonucleares com predomínio de neutrófilos durante as primeiras 24 h (Nauseef, 2007), havendo em seguida, a migração de monócitos circulantes que se transformam em macrófagos nos tecidos (Ringler, 2000; Abbas et al., 2012).

Os neutrófilos possuem grânulos citoplasmáticos ricos em uma vasta gama de moléculas bioativas (como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase). Estas moléculas altamente efetoras não são capazes de discriminar alvos de microorganismos ou do hospedeiro e, portanto, quando liberadas no microambiente celular são capazes de gerar danos colaterais no tecido. Mediadores lipídicos como as prostaglandinas e lipoxinas são cruciais na transição da inflamação inicial para a resolução deste processo. As lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e induzem o recrutamento de monócitos (Ruslan, 2008). As funções desempenhadas pelos macrófagos são diversas, incluindo a fagocitose para remoção de patógenos ou células necróticas ou senis, estão envolvidos na apresentação de antígenos que irão iniciar a resposta imune adquirida, potencialização das respostas celular e humoral pela expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas (como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF), os macrófagos participam ainda, na cicatrização de feridas pela síntese de elementos (como os fatores de crescimento) indutores de angiogênese, migração de fibroblastos, assim como sua divisão e produção de colágeno (Ringler, 2000; Ruslan, 2008). Os granulócitos eosinófilos também possuem um importante papel durante a inflamação. Apesar de em condições normais serem encontrados em baixos níveis na corrente sanguínea, estes podem elevar seu número durante o início da inflamação em resposta à quimiocinas. Estas células, além de apresentarem potencial microbicida, são fonte de diversos mediadores inflamatórios como os lipídicos (leucotrienos e prostaglandinas) e citocinas como as IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF, dentre outras. Os mastócitos possuem papel essencial no princípio das respostas vasculares e celulares pela rápida liberação de mediadores inflamatórios que atuam nas alterações capilares e também adesividade leucocitária ao endotélio (Ringler, 2000; Rottem e Mekori, 2005; Ruslan, 2008). Os linfócitos por sua vez, apresentam diversas populações com

distintas funções efetoras, destacando-se entre elas, a limitação da expansão de patógenos. Durante a resposta imune inata as células *natural killer* (NK) atuam principalmente contra a presença de vírus, exibindo atividades citotóxicas, por meio de moléculas efetoras como granzimas, perforinas, Fas-L e TRAIL e são fonte de citocinas pró-inflamatórias como IFN (Koyasu e Moro, 2012). Com o início da resposta imune adaptativa as células T e B coordenam os eventos celulares e humorais, respectivamente, no combate a patógenos intracelulares e extracelulares, respondendo aos antígenos de forma específica (Ringler, 2000; Koyasu e Moro, 2012).

O sucesso de uma resposta inflamatória é resultado não somente da eliminação do agente invasor, mas também dos processos de resolução e reparo do sítio lesionado, de forma a recuperar completamente a homeostasia funcional do tecido.

1.3 Doença de Chagas: considerações gerais

A doença de Chagas (DC) foi descrita pela primeira vez há mais de um século pelo médico sanitário Carlos Chagas (Chagas, 1909) e tem como agente etiológico o parasito intracelular *Trypanosoma cruzi*. Esta é considerada uma das 17 doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2010) que afetam populações que vivem principalmente em países de baixa renda e que apresentam infraestrutura sanitária e habitacionais inadequadas. Somado a isso, a intensa migração, com conseqüente aumento populacional, nas áreas urbanas, alterações climáticas, degradação ambiental, falta de políticas educacionais, além da proximidade peridomiciliar com vetores e animais contaminados, são fatores que favorecem a transmissão do *T. cruzi* e demais patógenos que causam enfermidades ao homem (Dias, 2013; WHO, 2016). Assim, devido ao baixo poder aquisitivo dos pacientes e deficiência financeira dos sistemas de saúde, não há interesse das indústrias farmacêuticas na produção e comercialização de medicamentos voltados para este segmento de patologias por não apresentarem o potencial de auferir lucros (DNDi, 2016). A DC afeta mais de 6 milhões de pessoas e apresenta distribuição limitada, primariamente ao continente americano, sendo endêmica em 21 países da

América Latina devido à existência de mais de 140 espécies do inseto vetor nessa região. No entanto, registra-se a ocorrência desta patologia em diversos países da Europa, no Canadá, nos Estados Unidos em alguns países do Pacífico Ocidental, devido principalmente ao deslocamento de pessoas infectadas (WHO, 2015; 2016). No Brasil, estima-se que 2-3 milhões de indivíduos estejam infectados, cuja maior incidência da doença ocorre na região norte do país (SVS, 2016).

1.3.1 Aspectos clínicos e patogênese da doença

A DC ocorre em duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda da doença tem início logo após infecção, com duração de 4-8 semanas, sendo na maioria das vezes assintomática (Rassi Jr et al., 2010; 2012). Quando apresentados sintomas, se caracterizam por febre, mal-estar, edema facial, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, miocardites e meningocefalites, além dos sinais de inoculação presentes na pele ou mucosa, como o sinal de Romaña e chagoma de inoculação (DNDi, 2016) (Coura e Borges-Pereira, 2010). Estas manifestações cessam em aproximadamente 90% dos indivíduos e a ocorrência de morte nesta fase é <5-10%. A maioria dos pacientes nunca irá desenvolver clinicamente a doença (60-70%), exibindo eletrocardiograma e exame radiológico normais, embora seja identificada a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgG). Entretanto, os demais indivíduos infectados (30-40%), na ausência de tratamento específico, desenvolvem a fase crônica sintomática, podendo surgir os sintomas anos ou mesmo décadas pós-infecção. A cardiopatia chagásica (Figura 1A) é a forma crônica mais severa e frequente, enquanto 10-20% podem desenvolver a forma digestiva (tipicamente megaesôfago e megacólon) (Figura 1B e 1C), sendo ainda frequentes as alterações neurológicas ou mistas (cardíacas e digestivas) (Rassi Jr et al., 2010; Carod-Artal e Gascon, 2010; WHO, 2016).

A cardiopatia chagásica crônica é a manifestação clínica mais significativa da patologia e possui como característica a presença de infiltrados inflamatórios multifocais e difusos. Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença ainda são controversos e diversos são os fatores propostos por

atuar na lesão cardíaca, onde podemos citar: (i) lesões neurogênicas; (ii) resposta imune específica contra o parasito ou seus antígenos presentes no tecido; (iii) miocitólise induzida pelo parasito; (iv) distúrbios microvasculares coronários e, (v) auto-imunidade induzida pelo parasito (Marin-Neto et al., 2007; Bonney e Engman, 2008). O avanço do quadro patológico pode resultar na morte súbita ou perda da funcionalidade do músculo cardíaco e sistema nervoso decorrentes da destruição progressiva provocada pelo parasitismo (WHO, 2016).

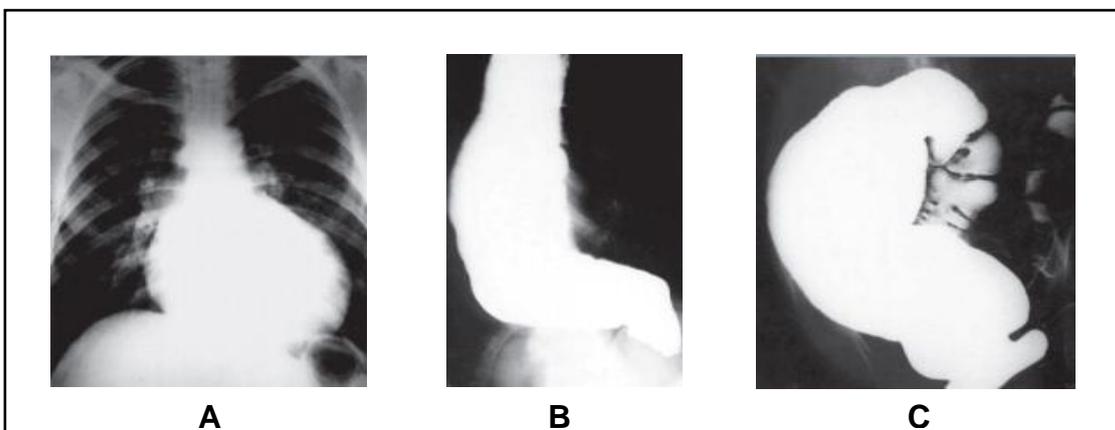


Figura 1. Achados clínicos da fase crônica da doença de Chagas: (A) Cardiopatia Chagásica, (B) Megaesôfago, (C) Megacólon (adaptado de Rassi Jr. et al., 2010).

1.3.2 Transmissão

A infecção é mais comumente adquirida pela via vetorial, por meio dos excretas (fezes e urina) de insetos triatomíneos (popularmente conhecidos como “barbeiros”) contendo as formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas) do *T. cruzi*, que são liberadas após o repasto sanguíneo. Outras formas de transmissão ocorrem pelas vias oral, congênita, transfusional, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (Rassi Jr, 2010; CDC, 2013). Devido a implementação de medidas de controle vetorial e do monitoramento de amostras de sangue para transfusão, assim como de órgãos para transplante, houve nas últimas décadas, um declínio no número de novos casos de

transmissão da doença de Chagas (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011). Porém, se faz necessário manter as políticas públicas de controle, assim como atuar na prevenção de outras formas de infecção que hoje, por exemplo, prevalecem o consumo de alimentos contaminados com o parasito. Essa via de infecção tem representado mais de 70% dos novos casos no Brasil nos últimos dez anos exibindo surtos regionais de infecção aguda, com manifestações clínicas mais severas e altas taxas de mortalidade (Pereira et al., 2009; Coura, 2015; SVS, 2016). Atualmente no Brasil, predominam os casos crônicos, com cerca de 2-3 milhões de infectados (Ministério da Saúde, 2015; SVS, 2016).

1.3.3 Formas evolutivas e ciclo de vida

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico e envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (mamíferos, como o homem) e no inseto vetor (triatomíneo). Assim, este parasito pode ser encontrado em três formas: (i) tripomastigota: presente na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) e na porção terminal do intestino do vetor (tripomastigotas metacíclicos), cujas formas são alongadas e levemente achatadas, com cinetoplasto em forma de rede ou cesta localizado na região posterior ao núcleo, flagelo que emerge da bolsa flagelar localizada em sua região posterior e percorre a membrana plasmática tornando-se livre na região anterior; (ii) amastigota: forma multiplicativa do parasito no hospedeiro vertebrado, que se apresenta arredondada, com cinetoplasto em forma de bastão e anterior ao núcleo, com flagelos curtos e, (iii) epimastigota: forma multiplicativa presente no intestino do vetor, apresenta corpo fusiforme, flagelo livre e cinetoplasto em forma de bastão localizado na região anterior ao núcleo (revisto em De Souza, 2002b).

Considerando o início do ciclo no inseto triatomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado, este ingere as formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridos se diferenciam em epimastigotas no intestino do vetor e posteriormente em tripomastigotas metacíclicas, que serão liberados com suas fezes e urina. Durante ou após o repasto sanguíneo, os tripomastigotas atravessam a mucosa e ou pele não

íntegra do hospedeiro mamífero, invadindo diferentes tipos de células nucleadas. No citoplasma, se diferenciam em amastigotas, a forma replicativa do parasito, e após alguns ciclos de multiplicação por divisão binária (com duração de aproximadamente 12 horas), se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos. Essas formas são majoritárias durante a ruptura das células hospedeiras e atingem a circulação sanguínea, invadindo novas células ou são ingeridas pelo vetor (De Souza, 2010; Bern, 2015).

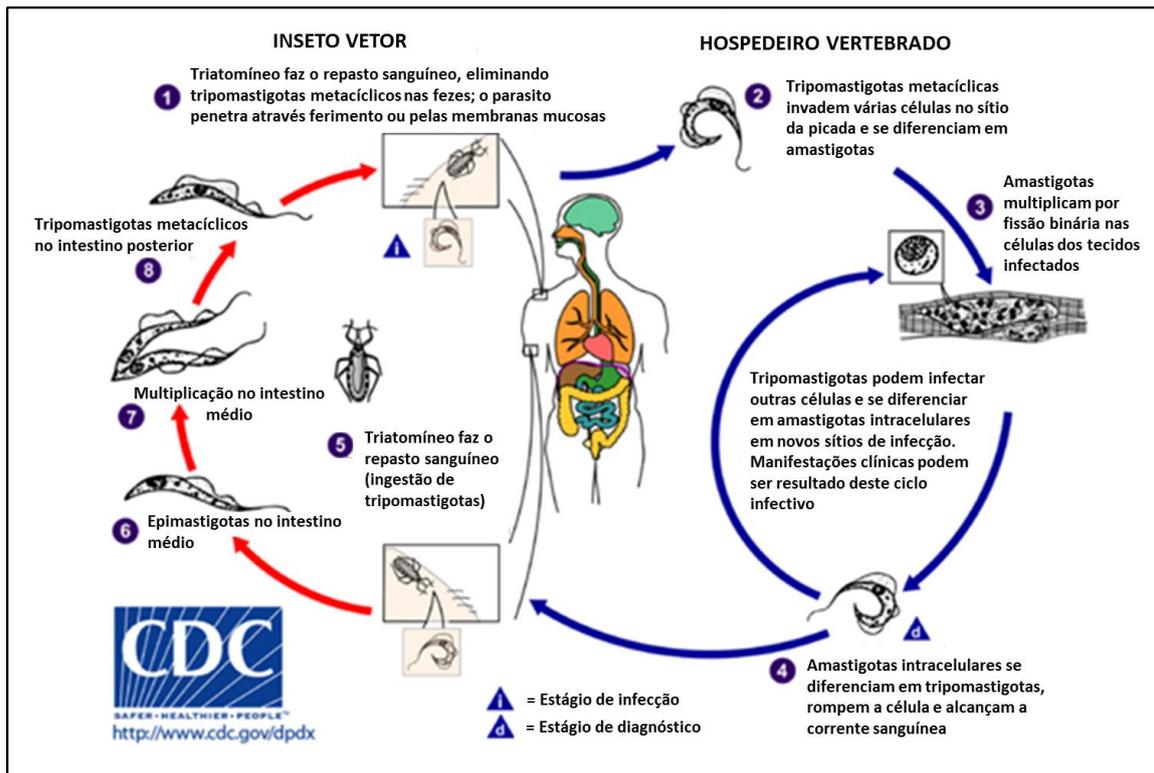


Figura 2. Esquema ilustrativo do ciclo de vida do *T. cruzi* (adaptado de CDC – Center for Disease Control and Prevention, 2016)

1.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da fase aguda se baseia na detecção das formas tripomastigotas por meio do exame microscópico direto, sendo possível visualizar os parasitos móveis contidos no sangue fresco, ou ainda, observados em esfregaços sanguíneos corados (ex. Giemsa), assim como pelo crescimento dos parasitos em hemocultura. Ensaio baseado na amplificação do DNA do *T. cruzi* pelo uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem

demonstrado elevada sensibilidade para detecção do parasito, sendo usado para o diagnóstico precoce, como nos casos de infecção congênita, transplante de órgãos de doadores infectados e exposição a acidentes laboratoriais. Na doença de Chagas congênita, métodos similares são utilizados, sendo o microhematócrito o método de escolha para sua identificação. Essa técnica possui alta sensibilidade e requer pequena quantidade de sangue, que pode ser obtida através do sangue periférico ou do cordão umbilical do neonato, sendo recomendada sua realização ainda no primeiro mês de vida. Apesar dos meses iniciais aumentarem a sensibilidade para o diagnóstico, muitas vezes a coleta não é aceita pelos pais e, portanto, se torna recomendado o teste sorológico após 9 meses, quando os anticorpos maternos já não são mais detectados na criança (Rassi Jr et al., 2010; Bern et al., 2011; Bern, 2015).

Para o diagnóstico durante a fase crônica, devido à baixa parasitemia, são utilizados pelo menos dois métodos sorológicos para IgG (geralmente o ELISA, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta), uma vez que estes não apresentam sensibilidade e especificidade o suficiente para serem utilizados individualmente. Sendo assim, resultados positivos de dois testes e preferencialmente baseados em diferentes antígenos do parasito são requeridos para confirmação. O uso de PCR nesta fase se relaciona a confirmação de resultados inconclusivos na sorologia. Esta também é uma importante ferramenta de monitoramento de falha terapêutica, porém não utilizada para determinação de cura parasitológica, uma vez que este pode representar apenas a ausência do DNA do parasito no momento da realização do teste (Rassi Jr et al., 2010; Bern, 2011; 2015).

1.3.5 Terapia

O tratamento etiológico da doença de Chagas é baseado em dois compostos nitroheterocíclicos que foram desenvolvidos empiricamente há mais de quatro décadas: Nifurtimox (Nf) e o Benznidazol (Bz) (Cerisola, 1977). O Nf, derivado do nitrofurano, foi introduzido em 1967 pela Bayer sendo comercializado como Lampit®. Seu mecanismo de ação envolve a geração do nitro radical aniônico pela ação de nitroredutases do *T. cruzi*, que por sua vez

reage com o O₂ levando à formação de espécies reativas de oxigênio (O₂- e H₂O₂). O parasito é parcialmente deficiente em mecanismos de detoxificação, sendo mais susceptível ao estresse causado pelo composto quando comparado à célula hospedeira (Docampo e Moreno, 1986; Bernardes et al., 2006). Sua produção foi descontinuada na década de 80, porém em 2000 retornou ao mercado em El Salvador para o tratamento combinado com a eflornitina para tripanossomíase africana (Jannin e Villa, 2007). O Bz é um nitroimidazol e foi introduzido pela Roche em 1972, sendo comercializado como Rochagan® ou Radanil® (Jannin e Villa, 2007). Seu efeito tripanocida é decorrente da redução de seus metabólitos que se ligam de forma covalente aos componentes do parasito (Polak e Richle 1978) e/ou ao DNA, lipídios e proteínas (Diaz de Toranzo et al., 1988). Em 2003, foi realizada a transferência da tecnologia deste quimioterápico para o governo brasileiro, sendo desde então produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (Jannin e Villa, 2007). Todavia, com a insuficiência de matéria prima, a sua produção foi interrompida em 2011, sendo retomada em 2012, onde também foi desenvolvida a formulação pediátrica do Bz em parceria com o DNDi (Lafepe, 2012; DNDi, 2016). Atualmente, iniciou-se a comercialização deste medicamento como Abarax® pelo laboratório ELEA em parceria com o Ministério da Saúde da Argentina e a Fundação Mundo Sano (MSF, 2012).

Ambos medicamentos apresentam considerável toxicidade, incluindo sintomas alérgicos, dermatites, pruridos, febre, anorexia, fadiga, intolerância gastrointestinal, dentre outros, o que leva a descontinuidade do tratamento por muitos pacientes (Viotti et al., 2009; Jackson et al., 2010; Pinazo et al., 2010). Além disso, estes são pouco ativos para o tratamento de portadores crônicos, uma vez que apresentam baixos índices de cura (<30%) e ainda, pela falta de consenso internacional acerca dos critérios utilizados para diagnóstico e cura parasitológica (Jannin e Villa, 2007). O projeto BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) objetivou avaliar se os indivíduos que vivem com cardiomiopatia chagásica poderiam apresentar melhora clínica ou até mesmo alcançar a cura após tratamento com Bz. Os resultados apontaram que comparado ao controle placebo, o uso do Bz não resultou em melhora significativa na avaliação cardíaca (Pecoul et al., 2016). Ainda neste contexto, podemos citar as diferenças na susceptibilidade das cepas de *T. cruzi*

encontrada em diferentes áreas geográficas (Murta e Romanha, 1998). Diante desses dados, se torna urgente o desenvolvimento de novos compostos seguros e eficazes durante ambas fases da doença. Visando otimizar esta descoberta, o TPP (Target Product Profile) visa estabelecer as principais características que devem apresentar os candidatos ideais ou aceitáveis para o tratamento da DC, tais como: eficácia e segurança superiores ao fármaco de referência (Bz), apresentar cura parasitológica durante ambas as fases da doença, atividade contra todas as cepas do parasito, ausência de toxicidade e de potencial pró-arrítmico (Chatelain e Konar, 2015).

Estudos clínicos prospectivos e randomizados de fase II conduzidos recentemente exploraram a atividade de dois azóis inibidores da biossíntese de lipídeos, como potenciais agentes anti-*T. cruzi*. O CHAGAZASOL, conduzido na Espanha, comparou a eficácia e segurança do antimicótico posaconazol e do benznidazol em pacientes portadores da doença crônica, revelando que apesar do tratamento com o posaconazol apresentar atividade antiparasitária, este revelou falha terapêutica com alta taxa de recrudescência (80-90%, enquanto a do Bz foi de 5%) (Molina et al., 2014; Chatelain, 2015). Resultados similares foram encontrados com a pró-droga do ravuconazol (E1224), que embora tenha exibido aspectos de segurança e supressão inicial da carga parasitária, a análise por PCR após um ano de terapia demonstrou pouca ou nenhuma eficácia deste inibidor quando comparada à do Bz (Chatelain, 2015). Além dos ensaios clínicos envolvendo azóis, um último estudo foi iniciado em 2014 avaliando um composto nitroheterocíclico, o fexinidazol, que obteve resultados promissores durante ensaios pré-clínicos. Infelizmente, por questões de segurança e tolerabilidade, este foi interrompido (Molina et al, 2016). Frente a este panorama, a estratégia de combinação de fármacos torna-se o foco do estudo STOP CHAGAS, que está em andamento, visando investigar a combinação do posaconazol e benznidazol em pacientes crônicos assintomáticos (Molina et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

O uso de sangue autólogo tem sido amplamente empregado como terapia alternativa e/ou complementar no tratamento de patologias de diferentes origens, como infecciosa, neoplásica e auto-imune. Apesar de seu uso por milhares de indivíduos em diversos países, e da existência de publicações que associam o uso desta prática à melhora clínica de pacientes portadores de enfermidades distintas, esta prática não possui embasamento científico através de estudos sistematizados experimentais e clínicos que justifiquem seu uso. Com relação aos seus mecanismos de ação, ainda existe uma importante lacuna nesta área, com escasso número de estudos que relatam as possíveis alterações fisiológicas induzidas pelo seu uso, assim como que comprovem sua eficácia e segurança. Frente a este cenário, o uso de sangue autólogo é considerado uma prática ilegal no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Doenças negligenciadas, que afetam populações que vivem em situação de pobreza e precárias condições sanitárias, não despertam o interesse das indústrias farmacêuticas para a produção e comercialização de medicamentos por não apresentam potencial retorno financeiro. Sendo assim, se torna necessária a busca por novos medicamentos e mesmo outras abordagens terapêuticas que possam complementar (de modo associado) o atual ou futuro arsenal farmacológico. Neste contexto, presentemente direcionamos nossos estudos de modo a investigar aspectos pré-clínicos relacionados a potenciais efeitos adversos desta prática em modelos experimentais murino, assim como explorar seus possíveis efeitos no curso de uma infecção parasitária fazendo uso de modelos de infecção aguda experimental pelo *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar através de estudos pré-clínicos as possíveis alterações induzidas pelo uso da terapia de sangue autólogo em camundongos Swiss Webster saudáveis, assim como seu possível impacto sobre a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- i) Explorar aspectos clínicos e perfil inflamatório de camundongos saudáveis submetidos ao tratamento com sangue autólogo.
- ii) Avaliar o possível impacto do uso de sangue autólogo sobre parâmetros parasitológicos (parasitemia e mortalidade), curva ponderal, e níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios no curso da infecção pelo *T. cruzi*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Primeiro bloco de estudos: análises em animais sadios

4.1.1 Esquemas de tratamento

Camundongos Swiss Webster machos obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Brasil) foram alojados em um máximo de cinco animais por gaiola e mantidos em uma sala convencional a 20-24 °C sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os animais foram permitidos aclimatar durante 7 dias antes de iniciar os experimentos e foram guarnecidos com água esterilizada e alimento *ad libitum* (Guedes-da-Silva et al., 2015). Os ensaios (n= 3) foram realizados pela injeção de sangue autólogo total (SA) previamente coletado da cauda do animal e administrado na região posterior do músculo quadríceps (10 e 20 µL na pata direita ou 10 µL em cada uma das patas esquerda e direita). O presente estudo foi conduzido seguindo procedimento de randomização para distribuição animal (peso de 18-20 g) nos diferentes grupos, conduzindo em paralelo, controles incluindo camundongos: (i) tratados com solução salina (NaCl 0.85%): (ii) apenas sangrados sem administração de sangue e (iii) não sangrados e nem injetados com sangue autólogo. O número de animais por grupo foi sempre superior a 3 (mínimo de 3 e máximo de 10). Dois conjuntos diferentes de protocolos foram realizados (Figura 3): (a) três administrações individuais intramusculares (im) de amostras de salina e SA com um intervalo de 5 dias entre cada injeção e avaliação de 48 até 168 h após término do tratamento (Figura 3A e B), e (b) tratamento único de salina ou SA seguido da análise de 2 até 168 horas após a última injeção (Figura 3C). A análise dos resultados primários (peso corporal, comportamento animal (atividades exploratórias e motora), efeitos clínicos adversos e taxas de sobrevivência) foi seguida de acordo com o planejamento temporal. No *endpoint* (entre 2-168 horas após última injeção), os camundongos foram submetidos a eutanásia e realizados os seguintes procedimentos (resultados secundários): (i) obtenção de sangue (punção cardíaca) para análise de hemograma completo, de marcadores bioquímicos

de lesões teciduais e do perfil de mediadores inflamatórios e, (ii) coleta de coxas dos animais para análise histopatológica de diferentes parâmetros, como infiltrado inflamatório e grau de lesão tecidual. Nos dois primeiros ensaios foi utilizado o esquema 1 (Figura 3A e B), sendo todos os camundongos injetados utilizando seringa de insulina (agulha de 13 x 0,45 mm (26G)) enquanto no terceiro ensaio foi empregado o esquema 2 (Figura 3C), no qual os animais foram tratados utilizando BD Ultra-Fine com agulha de 6 x 0,25 mm (31G). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC – número de licença CEUA L-016/14).
 Alterar linha do tempo para dias/semanas, Intercalando com as horas?

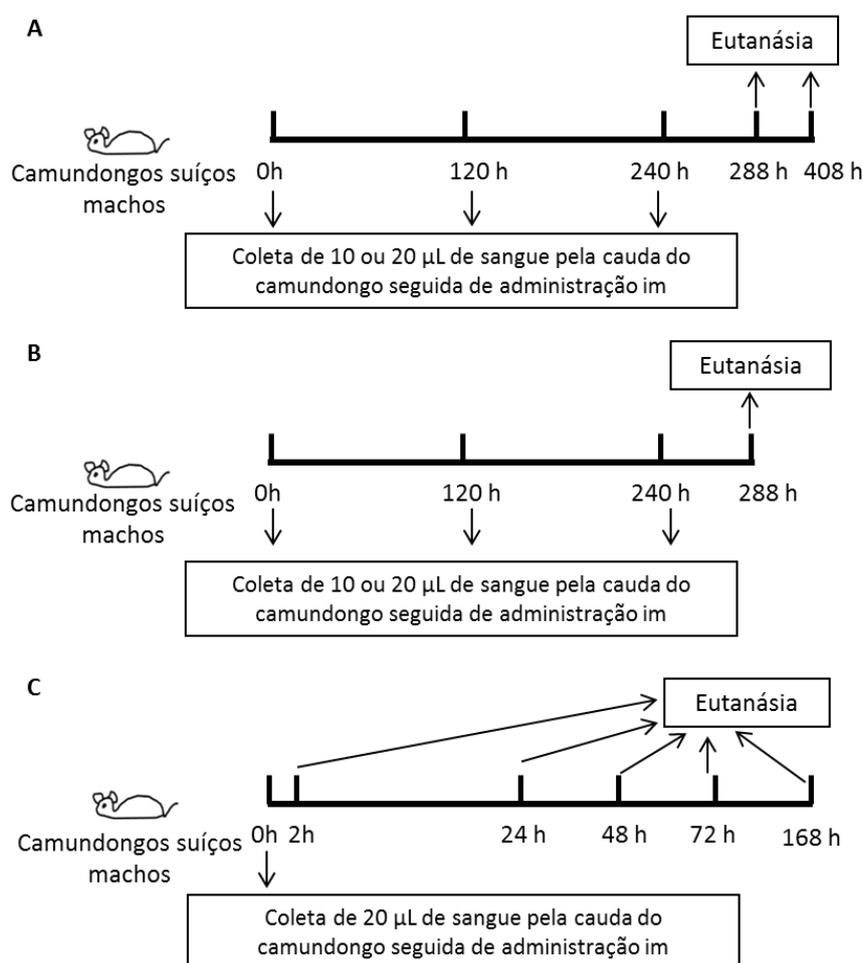


Figura 3. Abordagens de tratamento por via intramuscular de acordo com os diferentes esquemas. A e B (esquema 1): três administrações de SA com intervalos de cinco dias e C (esquema 2): única administração de SA. Grupos controle: administração de SAL, camundongos sangrados e não tratados e grupos de camundongos não sangrados e não tratados.

4.1.2 Análises de hemograma completo e bioquímica

Em cada *endpoint*, a análise bioquímica e de hemograma completo foram realizadas de amostras de sangue coletadas, por meio de punção cardíaca. Todas as análises bioquímicas foram executadas no ICTB da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil, Plataforma ICTB/Fiocruz), incluindo a determinação de marcadores teciduais plasmáticos como uréia (BUN), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK) utilizando Vitros 250 (Ortho Clinical-Johnson & Johnson), conforme descrito anteriormente (Guedes-da-Silva et al., 2016). Os resultados foram expressos como concentração de enzima (U/L) ou g/dL (para análise de uréia). Em todos os ensaios, os grupos não tratados e tratados foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) e os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$. A fim de discriminar as populações de leucócitos, os esfregaços sanguíneos coletados da veia da cauda foram preparados e inspecionados individualmente antes do tratamento e no *endpoint*. As amostras foram coradas com Giemsa e quantificadas por microscopia óptica para determinar o percentual (média e desvio padrão) de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

4.1.3 Análises comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados (no esquema 1 – ensaios 1 e 2) em uma sala climatizada. Para caracterizar a atividade espontânea dos animais, utilizamos a ferramenta de captura e gravação de imagens por vídeo Noldus EthoVision XT6 (Noldus Information Technology, Leesburg, Holanda). A arena foi definida como 12 retângulos, que foram divididos em áreas laterais e central. Na arena total, os retângulos foram calibrados com áreas iguais para assegurar a consistência dos parâmetros com os quais o aparelho detectou movimentos transicionais do camundongo. Esta análise considerou em momentos diferentes os seguintes parâmetros: (i) atividade locomotora, por exemplo, distância coberta (m) e velocidade média (cm/s) e, (ii) atividade exploratória, a frequência de deslocamento para a região central (número de

eventos) a cada 5 min e o tempo gasto nesta região (segundos). Os diferentes grupos foram comparados utilizando a análise pelo teste *t-Student* e os resultados considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$ (Silva et al., 2012).

4.1.4 Análises histológicas

Em cada *endpoint*, além da análise patológica geral (avaliação macroscópica), as coxas dos camundongos foram coletadas e fixadas com formaldeído a 10% em solução de PBS, descalcificadas em ácido etilenodiaminotetraacético a 10% (EDTA) e processadas rotineiramente para avaliação histológica (técnica de inclusão de parafina). Os cortes (5 μm) corados por hematoxilina-eosina (HE) foram analisados por microscopia óptica. A extensão dos infiltrados inflamatórios (mais de 10 células infiltrantes) foi determinada em pelo menos 5-10 campos a partir de imagens capturadas pela microscopia óptica (ampliação total, 100x) Axio Observer.A1 (Carl Zeiss). Para cada lâmina, pelo menos três cortes de cada camundongo foram avaliados (Molinari, 2010). A análise de variância (ANOVA) e os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$. Para os animais que exibiram infiltrados inflamatórios com perfil predominante de células polimorfonucleares, uma posterior coloração foi realizada utilizando o método Sirius red, que permite a identificação de eosinófilos (contados em pelo menos 100 células inflamatórias) (Llewellyn, 1970). O grau de lesão tecidual também foi realizado para caracterizar a extensão do infiltrado inflamatório (focal versus difuso) com a seguinte classificação: 0 = sem alteração, 1 = infiltrado inflamatório leve e localizado, 2 = infiltrado inflamatório leve e multifocal, 3 = infiltrado inflamatório moderado e localizado, 4 = infiltrado inflamatório moderado e multifocal, 5 = infiltrado inflamatório grave e difuso.

4.1.5 Peso corpóreo e de órgãos e taxas de sobrevivência

A variação do peso corpóreo e as taxas de mortalidade foram verificadas individualmente semanalmente e diariamente, respectivamente (Timm et al.,

2014). Em cada *endpoint*, o coração, o baço, o fígado e os rins foram coletados e seu respectivo peso mensurado (Silva et al., 2012). Em todos os ensaios, os diferentes grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) e os resultados considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$.

4.1.6 Análise do perfil de citocinas por citometria de fluxo

A análise do perfil de citocinas foi realizada por citometria de fluxo utilizando amostras de plasma coletadas dos animais por punção cardíaca em cada endpoint. Utilizou-se o kit Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San José, CA) para Interleucina (IL) -17A, IL-10, Interferon (IFN)-gama, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), IL-6, IL-4 e IL- 2, de acordo com as instruções do fabricante, sendo as amostras adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e análise de dados realizada por meio do software FCAP (BD) (Muhammad et al., 2016). Em todos os ensaios os diferentes grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis e os resultados considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$.

4.2 Segundo bloco de estudos: análises em animais infectados experimentalmente pelo *T. cruzi*

4.2.1 Solução estoque de benznidazol

Como fármaco de referência para a doença de Chagas, foi utilizado benznidazol (Bz) (N-benzil-2-nitroimidazole acetamida) adquirido do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). A solução estoque foi preparada em água destilada estéril com Tween 80 a 3% (Sigma-Aldrich) e antes do uso foi diluído em água destilada estéril para administração via oral (per oral = p.o.) (Guedes et al., 2015).

4.2.2 Parasitos

Tripomastigotas sanguíneos (TS) de *T. cruzi* da cepa Y foram coletados por punção cardíaca, no pico da parasitemia, que corresponde ao 7-8º dia pós infecção (dpi), de camundongos Swiss Webster, previamente infectados, como descrito em Meirelles et al. (1982).

4.2.3 Infecção

Camundongos machos Swiss Webster (10-13 g) foram fornecidos pelo ICTB/Fiocruz, alojados em um máximo de cinco por gaiola e mantidos em sala convencional a 20-24 °C sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os animais foram permitidos aclimatar durante 7 dias antes de iniciar os experimentos e foram guarnecidos com água esterilizada e alimento *ad libitum*. A infecção foi realizada por injeção intraperitoneal (i.p.) com 10^4 TS (cepa Y). Os camundongos não infectados com a mesma idade foram mantidos em condições idênticas.

4.2.4 Esquema de tratamento

Camundongos Swiss Webster machos foram inoculados via im (como descrito no item 4.1.1 com 20 µL de SA ou sangue heterólogo SH na região posterior do músculo quadríceps da pata direita ($n \geq 6$). O tratamento com SH consistiu na coleta (doador – animal 1) e administração de sangue (receptor - animal 2) (e vice-versa), utilizando sempre o mesmo doador e receptor para as trocas de sangue cujos animais foram previamente marcados com uso de ácido pícrico ($n=1$ marcação na cabeça, $n=2$ no dorso, $n=3$ na cauda, $n=4$ no membro anterior direito, $n=5$ no membro anterior esquerdo e $n=6$ no membro posterior direito). Os grupos controle ($n \geq 6$) consistiram em: (i) animais submetidos a injeção de 20 µL de solução salina (SAL - NaCl 0,85%); (ii) animais tratados com Bz (dose ótima - 100 mg / kg); (iii) animais apenas infectados e não tratados; (iv) animais apenas infectados e tratados com veículo (Tween 80, p.o.) e, (v) animais não infectados e não submetidos a qualquer tipo de intervenção. A análise de parasitemia, taxas de mortalidade e peso corpóreo foi seguida ao longo dos ensaios e no *endpoint* (30 dias após o fim do tratamento) os camundongos foram eutanizados. Nos grupos SA, SH e SAL, os animais

foram tratados utilizando BD Ultra-Fine com agulha 6 x 0,25 mm (31G). Diferentes conjuntos de protocolos foram realizados (Figura 4): (a) administração via im única ou múltipla (três vezes com intervalos de 5 dias cada) de SA, SAL e Bz (Figura 4A) 2 e 24 h antes da infecção dos animais com *T. cruzi* e (b) injeção com SA, SAL, SH, veículo e Bz após infecção com formas TS com administrações múltiplas (por até 10 dias consecutivos) iniciadas 1 ou 5 dias pós inoculação do parasito (Figura 4B). Em todos os ensaios, apenas os camundongos com parasitemia positiva foram utilizados nos grupos infectados. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC – número de licença CEUA L-032/2016).

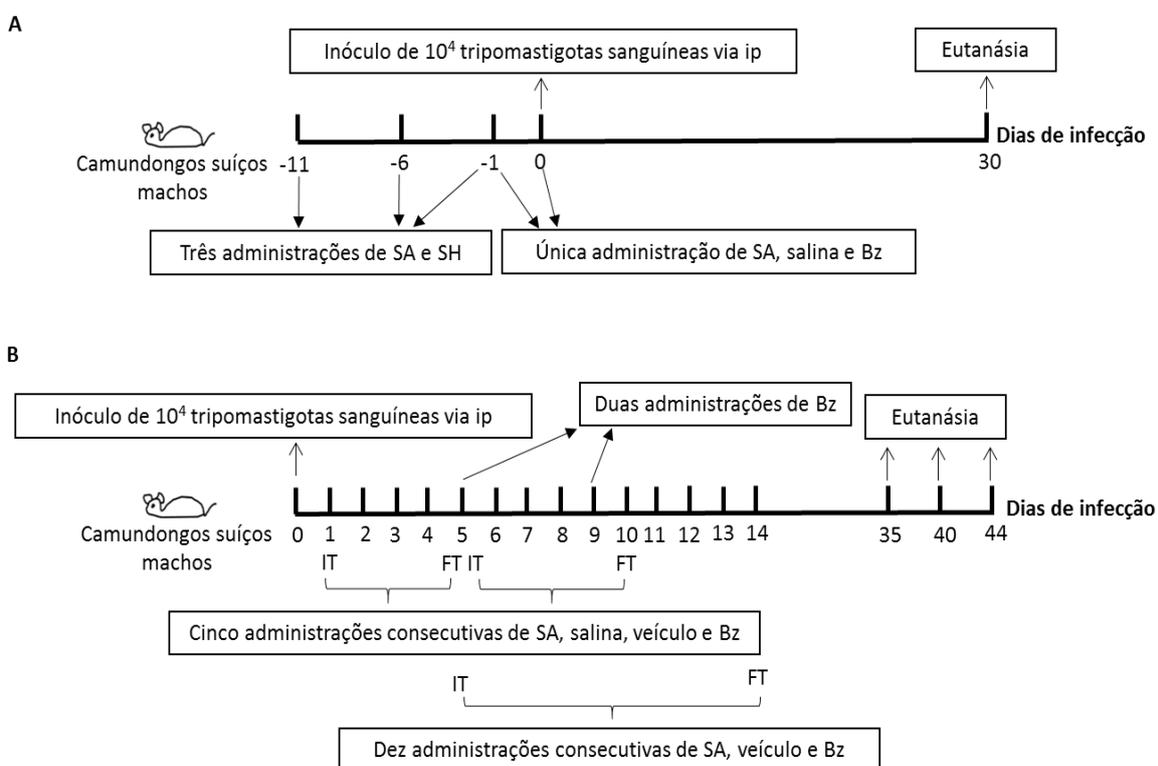


Figura 4. Esquemas de tratamento empregados antes (A) e após (B) a infecção pelo *T. cruzi* (cepa Y, dia 0) utilizando modelo de infecção aguda (Batista et al., 2010). A terapia foi administrada pela via intramuscular (sangue autólogo total – SA e sangue heterólogo total – SH) e oral (benznidazol – Bz) utilizando de um até dez dias de administração. Grupos controle: salina, Bz ou veículo, infectado e não tratado e não infectado e não tratado. IT= Início da terapia, FT= Fim da terapia.

4.2.5 Parasitemia, peso corpóreo e taxas de mortalidade

A parasitemia foi verificada pelo método de Pizzi-Brener (Brener, 1962) a partir do 5º dpi (início da parasitemia). Os camundongos foram individualmente avaliados pela quantificação microscópica direta do número de parasitos em 5 µl de sangue (utilizando lâmina e lamínulas de 18 x 18 mm) (Guedes et al., 2016). As taxas de mortalidade foram verificadas diariamente e expressas como mortalidade cumulativa (MC), como descrito anteriormente (Timm et al., 2014). O peso animal foi determinado semanalmente em cada grupo (Batista et al., 2010). Para a comparação entre grupos, a análise de variância (ANOVA) foi empregada e os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p \leq 0.05$.

4.2.6 Análise do perfil de citocinas por citometria de fluxo

A análise do perfil de citocinas foi realizada por citometria de fluxo utilizando amostras de plasma coletadas dos animais por punção cardíaca no 9º (pico da parasitemia) e 40º dpi (30 dias após fim do tratamento), seguindo metodologia relatada no item 4.1.6.

5 RESULTADOS

5.1 Primeiro bloco de estudos: análises em animais sadios

5.1.1 Ensaios com três administrações (Esquema 1)

No esquema 1, os animais receberam três injeções de 10 ou 20 µL de SA e SAL. Nossa análise não-invasiva mostrou que tanto o SA quanto SAL não induziram diferenças no ganho de peso animal e no tamanho e peso dos órgãos coração, baço, fígado e rins (dados não mostrados). Também não foram observadas em todos os grupos testados, alterações no comportamento (atividades exploratórias e motora – Figura 5) dos animais, exceto pelo comprometimento da marcha em 20% dos animais que receberam 20 µL de SA na mesma pata. Após 48 h da terceira administração de SA, o hemograma (Tabela 1) mostrou redução estatisticamente significativa no número de leucócitos (WBC) quando comparado ao grupo controle (que não recebeu qualquer tipo de intervenção), sendo mais evidente nos animais que receberam 20 µL de SA, embora ainda dentro do intervalo dos valores de referência fornecido pelo ICTB/Fiocruz. A análise estatística também mostrou redução significativa no número total de eritrócitos (RBC) ($p \leq 0,05$) em todos os grupos que sofreram qualquer tipo de intervenção (incluindo aqueles que foram apenas sangrados) em relação aos animais que não foram sangrados nem inoculados. Quanto ao número de plaquetas, houve uma diminuição estatisticamente significativa 48 h após a última administração de 20 µL de SA. Para os outros parâmetros, não foram observadas diferenças significativas no hemograma dos animais (Tabela 1).

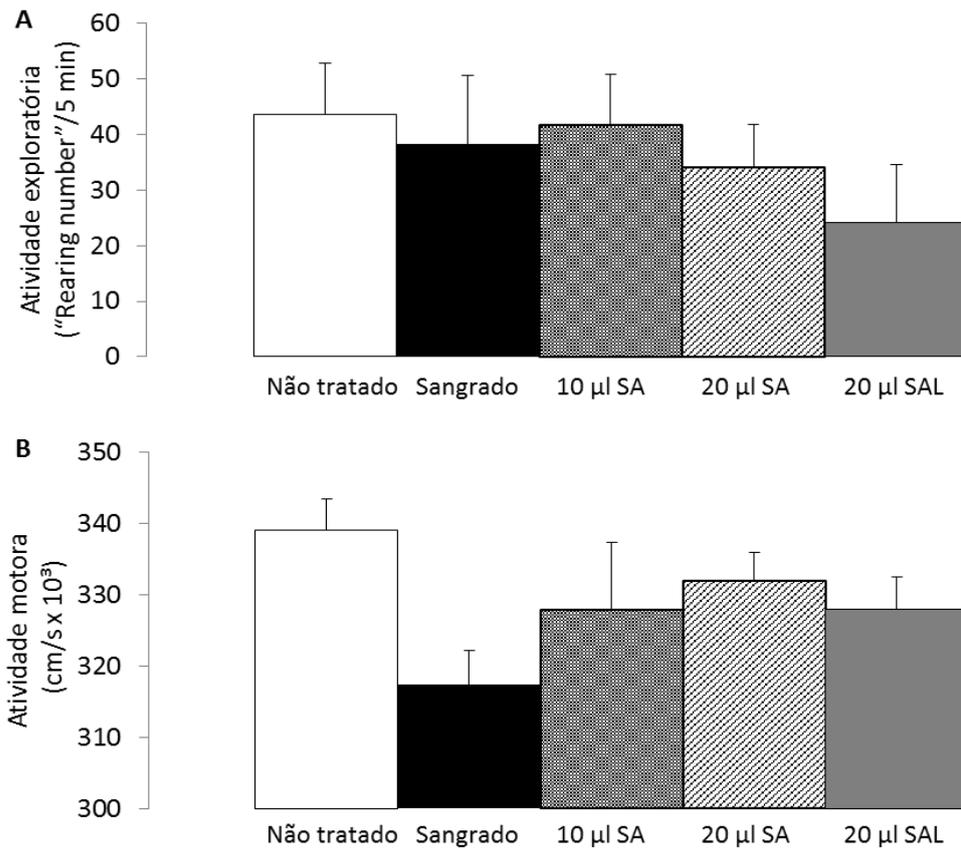


Figura 5. Aspectos comportamentais (atividade animal espontânea) avaliada por testes de campo aberto através de ferramentas de captação e gravação de imagens por vídeo. Após 24 h da última administração de SA e SAL (três administrações de 10 ou 20 µL com intervalo de cinco dias) os camundongos foram analisados para observar as atividades (A) exploratória e (B) motora.

Tabela 1. Análise de hemograma (média e DP) após 48 h da administração ou não de SA e SAL (três administrações com intervalo de cinco dias – esquema 1) e de 72 h e 168 h após injeção no esquema de única administração (esquema 2)

Grupo	RBC (milhões/mm ³)	WBC (mil/mm ³)	Plaquetas (mil/mm ³)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fm ³)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Esquema 1								
48 h								
Não tratado	9.0 ± 0.2	14.4 ± 1.6	1108.3 ± 185.0	14.4 ± 0.3	50.5 ± 1.0	56.1 ± 1.6	16.0 ± 0.1	28.6 ± 0.7
Sangrado	6.6 ± 1.0*	6.3 ± 4.0*	692.5 ± 454.1	11.0 ± 1.7	38.8 ± 5.4	58.4 ± 0.9	16.6 ± 0.4	28.5 ± 0.5
10 µL SA	7.4 ± 0.4*	6.0 ± 0.6*	624.5 ± 355.7	12.2 ± 0.3	43.3 ± 1.1	58.4 ± 1.3	16.4 ± 0.5	28.2 ± 0.0
20 µL SA	6.7 ± 1.1*	3.2 ± 0.6*	237.0 ± 86.3*	11.1 ± 1.7	38.4 ± 5.9	57.4 ± 0.3	16.6 ± 0.1	28.9 ± 0.0
20 µL SAL	7.4 ± 0.8*	7.4 ± 4.0*	900.2 ± 508.1	12.4 ± 1.3	42.9 ± 4.8	57.9 ± 0.7	16.8 ± 0.4	29.0 ± 0.7
Esquema 2								
72 h								
Sangrado	7.8 ± 0.1	12.1 ± 9.9	771.6 ± 67.2	12.9 ± 0.4	47.9 ± 1.3	60.8 ± 2.5	16.4 ± 0.5	27.0 ± 0.9
10 + 10 µL SA	8.1 ± 0.2	12.0 ± 6.6	1139.3 ± 53.5*	13.1 ± 0.3	47.1 ± 1.6	57.7 ± 0.5	16.1 ± 0.5	27.9 ± 0.3
20 µL SA	8.6 ± 0.1*	11.6 ± 5.0	1251.0 ± 164.0*	13.5 ± 1.0	48.9 ± 0.5	57.0 ± 0.3	15.8 ± 0.3	27.7 ± 0.4
10 + 10 µL SAL	7.7 ± 0.8	15.6 ± 5.3	1245.0 ± 132.9*	12.1 ± 1.3	43.1 ± 6.0	55.8 ± 1.6	15.7 ± 0.1	28.2 ± 1.0
20 µL SAL	8.2 ± 0.2	9.7 ± 1.1	1231.0 ± 193.7*	12.8 ± 0.7	48.7 ± 0.3	59.1 ± 2.5	15.6 ± 1.5	26.3 ± 1.3
168 h								
10 + 10 µL SA	8.5 ± 0.5	12.5 ± 4.2	1245.6 ± 312.9	14.3 ± 0.9	52.8 ± 3.2	62.2 ± 1.2	16.8 ± 0.4	27.0 ± 0.1
20 µL SA	8.6 ± 0.0	7.5 ± 0.4	1461.0 ± 39.6	13.8 ± 1.0	51.0 ± 0.6	59.2 ± 0.7	16.0 ± 1.0	27.1 ± 0.2
10 + 10 µL SAL	8.5 ± 0.5	11.8 ± 3.8	1167.5 ± 240.9	14.2 ± 0.7	52.0 ± 2.6	61.0 ± 1.6	16.6 ± 0.4	27.2 ± 0.3
20 µL SAL	8.8 ± 0.2	12.7 ± 3.3	1368.0 ± 168.9	14.3 ± 0.4	52.4 ± 1.0	59.5 ± 1.05	16.3 ± 0.5	27.4 ± 0.4

RBC indica eritrócitos; WBC, leucócitos; HGB, dosagem de hemoglobina; HCT, avaliação de hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, média corpuscular de hemoglobina; MCHC, média da concentração corpuscular de hemoglobina. Valores de referência (ICTB/Fiocruz): RBC = 5.67 a 6.91; WBC = 2.45 a 4.07; Plaquetas = 195 a 654.00; HGB = 11.80 a 13,08; HCT = 50.20 a 52.20; MCV = 57.32 a 61.28; MCH = 18.57 a 21.75; MCHC = 31.93 a 36.47. *ANOVA ($p \leq 0.05$) = não tratado/controle sangrado

Os dados bioquímicos do esquema 1 revelaram ausência de alterações significativas entre os grupos estudados, exceto redução dos níveis de ALT após 48 h de administração de 10 µL de SA. Uma discreta elevação dos níveis de uréia no grupo apenas sangrado, assim como nos animais que receberam 10 µL de SA e com 20 µL de SAL (Tabela 2). Os achados bioquímicos observados após 168 h da última injeção não revelaram significativas diferenças entre os grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 2. Análise bioquímica (média e desvio) de marcadores de lesão tecidual dos grupos estudados após 48 h (três administrações com intervalo de cinco dias – esquema 1) e 2 - 168 h (administração única – esquema 2) de injeção ou não com SA e SAL

Grupo	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	CK (U/L)	AST (U/L)
Esquema 1 (Ensaio 1)				
48 h				
Não tratado	31.6 ± 6.6	52.7 ± 7.6	679.0 ± 110.0	nd
Sangrado	26.2 ± 7.0	66.0 ± 5.8*	330.2 ± 230.2	nd
10 µL SA	22.5 ± 4.8*	69.0 ± 5.0*	646.0 ± 261.2	nd
20 µL SA	38.8 ± 10.1	56.8 ± 6.5	465.8 ± 262.5	nd
20 µL SAL	33.2 ± 12.2	62.5 ± 4.1*	454.4 ± 254.0	nd
168 h				
Não tratado	47.0 ± 3.4	56.8 ± 6.8	400.3 ± 387.9	nd
Sangrado	52.2 ± 7.4	65.0 ± 21.3	358.5 ± 172.1	nd
10 µL SA	47.4 ± 4.0	53.1 ± 8.0	227.6 ± 83.6	nd
20 µL SA	43.6 ± 10.0	55.9 ± 10.2	160.0 ± 46.5	nd
20 µL SAL	46.5 ± 1.9	58.5 ± 8.5	142.4 ± 87.8	nd
Esquema 1 (Ensaio 2)				
48 h				
Sangrado	51.3 ± 4.3	48.1 ± 4.1	241.5 ± 167.7	nd
20 µL SA	56.8 ± 17.9	41.1 ± 11.7	226.9 ± 222.4	nd
20 µL SAL	57.6 ± 16.7	41.3 ± 9.0	423.5 ± 536.2	nd
Esquema 2				
2 h				
Sangrado	nd	nd	nd	nd
10 + 10 µL SA	127.0 ± 18.3	111.0 ± 117.3	2612.0 ± 452.5	418.0 ± 104.6
20 µL SA	111.0 ± 15.5	Nd	947.0 ± 43.8	214.0 ± 45.2
10 + 10 µL SAL	94.6 ± 12.8	31.6 ± 3.93	1779.3 ± 510.4	244.0 ± 87.9
20 µLSAL	nd	nd	nd	nd
24 h				
Sangrado	nd	60.2 ± 8.3	3127.0 ± 1234.6	nd

10 + 10 µL SA	1198.0 ± 899.4	56.9 ± 2.4	nd	481.0 ± 476.6
20 µL SA	nd	63.6 ± 0.8**	nd	820.0 ± 905.1
10 + 10 µl SAL	1296.0 ± 794.8	41.1 ± 8.3	3293.0 ± 106.0	1387.0 ± 442.6
20 µl SAL	1218.0 ± 1097.4	47.5 ± 2.7	1801.5 ± 840.7	1346.0 ± 613.1
48 h				
Sangrado	nd	nd	nd	nd
10 + 10 µL SA	653.3 ± 342.0	48.9 ± 6.3	nd	1088.0 ± 589.4
20 µL SA	246.0 ± 152.7**	nd	nd	413.3 ± 443.2**
10 + 10 µl SAL	566.0 ± 95.6	62.1 ± 2.5	2416.0 ± 811.7	1116.6 ± 520.9
20 µl SAL	1263.0 ± 18.3	57.4 ± 11.3	3011.0 ± 1398.7	1583.0 ± 165.4
72 h				
Sangrado	nd	nd	nd	nd
10 + 10 µL SA	nd	44.9 ± 22.8	3664.5 ± 2484.1	nd
20 µL SA	nd	54.3 ± 7.7	3927.0 ± 521.9**	nd
10 + 10 µl SAL	1543.5 ± 1342.8	52.3 ± 3.5	4642.5 ± 939.8	1744.5 ± 1139.1
20 µl SAL	251.5 ± 26.0	55.0 ± 15.0	1608.0 ± 432.7	421.5 ± 350.0
168 h				
Sangrado	nd	53.1 ± 2.4	nd	nd
10 + 10 µL SA	1597.0 ± 1262.9	nd	2451.7 ± 2210.1	1840.0 ± 942.7
20 µL SA	1180.0 ± 1606.5	nd	1764.6 ± 1393.8	920.0 ± 747.5
10 + 10 µl SAL	1480.0 ± 451.7	60.0 ± 2.5*	1242.0 ± 452.0	1311.3 ± 390.0
20 µl SAL	1140.5 ± 868.9	55.5 ± 3.8	938.5 ± 454.4	1338.0 ± 743.0

ALT indica alanina aminotransferase; CK, creatina quinase; AST, aspartato aminotransferase; nd, não determinado. Valores de referência (ICTB/ Fiocruz): ALT = 28 a 132; BUN = 18 a 29; CK = 68 a 1070; AST= 59 a 247. ANOVA ($p \leq 0,05$) = *controle não tratado/sangrado; **administração de SAL e SA

A análise histológica das coxas dos animais conduzida pela coloração por HE mostrou a presença de intenso infiltrado inflamatório 48 h após a injeção de sangue e salina, sendo mais intenso (Figura 6) e estatisticamente significativo nos animais submetidos à administração de SA em relação ao grupo SAL (Tabela 3). Após 48 h de administração, com exceção de um animal de SA (20 µL), todos os grupos de animais (SA e SAL) apresentaram predominância de células mononucleares no infiltrado inflamatório (Figura 6). Os dados revelam valores (média e desvio padrão) no número de células inflamatórias por campo de $68,9 \pm 17,7$ e de $58,6 \pm 25,4$ para animais inoculados com 20 µL SA e SAL, respectivamente, enquanto o grupo não tratado ou somente sangrado obteve um score de 0 (Tabela 3A, $p \leq 0,05$). Com relação ao grau lesão, observamos que animais que receberam SA apresentaram valores de $2,0 \pm 0,0$ e para SAL $1,4 \pm 0,6$ (Tabela 3B).

Após 168 h da última injeção de SA e SAL a análise histopatológica (com coloração com HE) dos diferentes grupos estudados não revelou inflamação e lesão tecidual (dados não mostrados), assim como, não foram detectadas alterações nos níveis plasmáticos de CK mensuradas pelas análises bioquímicas (Tabela 2).

Como não observamos diferenças significativas no conjunto de dados entre os grupos que receberam 10 e 20 μL de SA (Tabelas 1, 2 e 3), estudos posteriores foram conduzidos com o maior volume (20 μL). Neste segundo ensaio, confirmamos que 48 h após a última injeção (3 administrações de SA e SAL), não houve alterações relevantes nos diferentes parâmetros estudados, incluindo peso corpóreo e de órgãos (dados não mostrados), bem como na análise bioquímica do plasma dos animais (Tabela 2). Com relação às atividades exploratórias e motora, novamente embora não tenham sido encontradas importantes diferenças entre os grupos estudados, 40% dos animais que receberam 20 μL de sangue apresentaram comprometimento da marcha na pata onde a administração foi realizada.

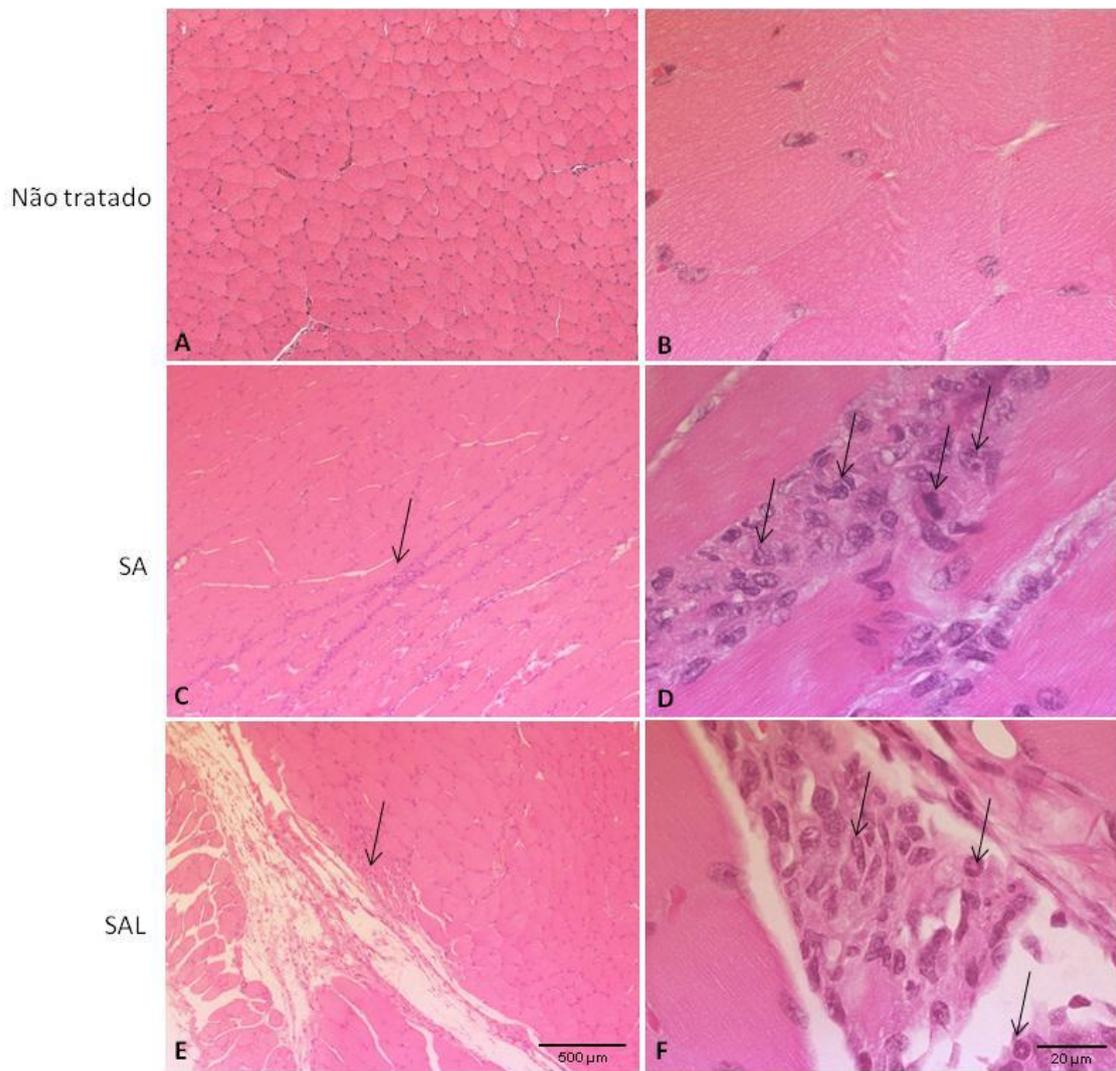


Figura 6. Análise histopatológica da presença de infiltrado inflamatório. A avaliação por microscopia óptica foi realizada por meio da coloração com hematoxilina-eosina a partir da região posterior do músculo quadríceps coletada de camundongos 48 h após injeção de SA e SAL (C-F) em comparação com amostras obtidas de animais não tratados (A-B). Os camundongos foram submetidos a três administrações de 20 μ L de SA (C e D) e de SAL (E e F) com intervalo de cinco dias (esquema 1). Aumentos originais $\times 100$ (A, C e E) e $\times 1000$ (B, D e F). Setas: infiltrado inflamatório.

Tabela 3. Análise da presença de células inflamatórias (número de células inflamatórias por campo) (A) e grau de lesão tecidual (B) após 48 h da administração de SA e SAL (três administrações com intervalo de cinco dias - esquema 1) e após 2-168 h (única administração - esquema 2).

Células inflamatórias/campo

Esquema 1		Esquema 2					
Grupo	48 h	Grupo	2 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Não tratado	0.0 ± 0.0	Sangrado	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Sangrado	0.0 ± 0.0	10 + 10 µL SA	57.2 ± 8.8*	43.6 ± 5.8*	46.2 ± 13.9*	52.5 ± 17.8*	13.8 ± 27.5*
10 µL SA	70.5 ± 39.9*	20 µL SA	64.6 ± 13.4*	100.6 ± 57.0*	43.5 ± 11.3*	52.7 ± 12.3*	28.6 ± 25.1*
20 µL SA	68.9 ± 17.7* **	10 + 10 µl SAL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	29.2 ± 26.0*	nd	28.6 ± 35.1*
20 µL SAL	58.6 ± 25.4*	20 µL SAL	18.8 ± 26.6*	11.8 ± 16.7*	43.7#*	42.2#*	42.9 ± 40.1*

A

Grau lesão tecidual

Esquema 1		Esquema 2					
Grupo	48 h	Grupo	2 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Não tratado	0.0 ± 0.0	Sangrado	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Sangrado	0.0 ± 0.0	10 + 10 µL AS	3.3 ± 1.2	2.0 ± 1.0*	3.0 ± 1.4*	2.7 ± 1.2	0.5 ± 1.0
10 µL SA	0.8 ± 0.8	20 µL AS	3.3 ± 1.2*	3.0 ± 1.0*	2.0 ± 0.0	2.7 ± 1.2	1.0 ± 1.0
20 µL SA	2.0 ± 0.0	10 + 10 µl SAL	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.0	nd	0.5 ± 0.6
20 µL SAL	1.4 ± 0.6*	20 µL SAL	1.0 ± 1.4	0.5 ± 0.7	2#	2#	0.7 ± 0.6

B

nd, não determinado. ANOVA ($p \leq 0,05$) = *não tratado/ sangrado; **SA e SAL. O grau de lesão tecidual foi realizado com a seguinte classificação: 0 = sem alteração; 1 = infiltrado inflamatório leve e localizado; 2 = infiltrado inflamatório leve e multifocal; 3 = infiltrado inflamatório moderado e localizado; 4 = infiltrado inflamatório moderado e multifocal; 5 = infiltrado inflamatório grave e difuso. # = Análise individual

5.1.2 Ensaio de administração única (análise de 0, 2, 24, 48, 72 e 168 horas - Esquema 2)

A seguir, visando determinar se apenas uma administração de SA poderia desencadear um perfil inflamatório tissular semelhante à administração repetida de sangue e solução salina, outro conjunto de estudos (esquema 2) foi conduzido. Os camundongos foram injetados uma única vez utilizando 20 μ L de SA e SAL numa única pata ou fracionando este volume nas duas patas posteriores (10 μ L de volume em cada uma, Figura 3).

Nossos dados mostram que até 168 horas após a administração, nenhum grupo apresentou diferenças significativas relacionadas ao peso corpóreo e de órgãos (dados não mostrados) em relação aos grupos controle (SAL e apenas sangrado). Não observamos alterações nos estudos comportamentais em todos os grupos avaliados.

Infelizmente, a análise bioquímica de marcadores plasmáticos de lesão tecidual realizada no ICTB/Fiocruz revelou inconsistentes alterações em especial para ALT, AST e CK. A perda de amostras dos nossos controles, em alguns tempos avaliados, comprometeu a avaliação geral destes parâmetros.

A análise de hemograma não demonstrou consistentes alterações entre os grupos estudados, exceto que todos os camundongos que receberam qualquer tipo de injeção, apresentaram níveis de plaquetas elevados ($p \leq 0.05$) após 72 h de tratamento, em comparação com o grupo controle (Tabela 1). A análise cinética dos esfregaços de sangue corados pelo Giemsa (Figura 7A) revelou que a principal diferença identificada pelos testes estatísticos foi um pequeno aumento no percentual de monócitos em 48 h (4%), quando os animais foram submetidos à injeção de SA em relação aos tratados com SAL (0,7%) (Figura 7A). Em 168 h ocorreu diminuição de monócitos também nos animais tratados com SA (0%) com relação ao controle apenas sangrado (1%).

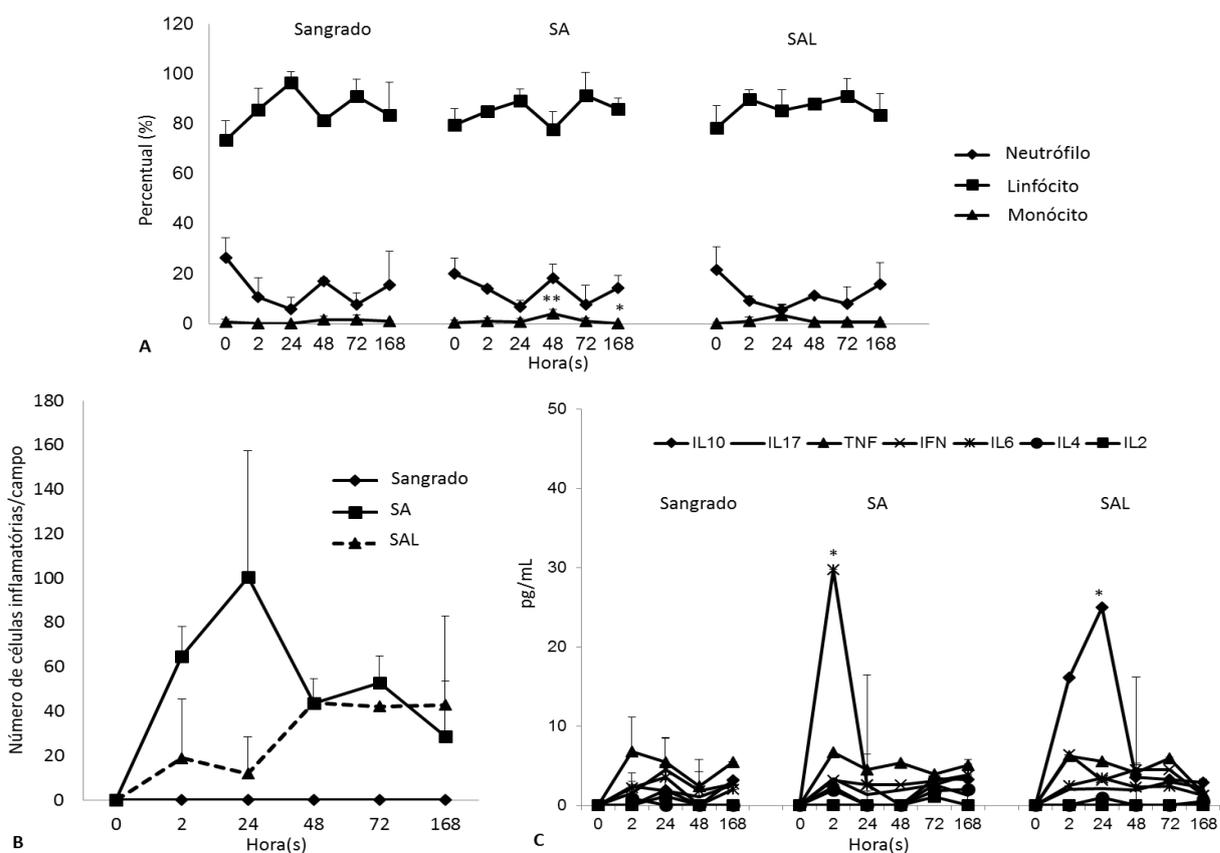


Figura 7. Análise de leucograma, perfil inflamatório tecidual e plasmático. Média e DP de (A) leucograma por esfregaço de sangue corado pelo Giemsa, (B) inflamação tecidual e (C) citocinas de amostras de sangue e coxas de camundongos submetidos ou não à injeção de SA e SAL nos períodos de 2 a 168 h após o tratamento (administração única - esquema 2). *ANOVA = $p \leq 0,05$ (n = 2-3). *Sangrado/tratado; ** administração de SAL e SA.

A avaliação do perfil inflamatório (número de células inflamatórias por campo) mostrou uma diferente cinética quando a administração de SAL e SA foram realizadas. Após 2 h de injeção com 20 μ L, observa-se forte resposta inflamatória nos sítios de inoculação de SA na pata dos animais tratados (Figuras 7B e 8B, Tabela 3), sendo mais intensa ($64,6 \pm 13,4$) em comparação com a exposição à SAL ($18,8 \pm 26,6$) (Figuras 7B e 8C, Tabela 3). Esta diferença foi mantida até o tempo de 24 h pós-exposição quando observamos os valores de $100,6 \pm 57,0$ e $11,8 \pm 16,7$ para SA e SAL, respectivamente

(Figuras 7 e 8, Tabela 3). Quando os volumes aplicados foram fracionados (10 μ L + 10 μ L), houve diferenças em relação a administração de um único volume de 20 μ L, especialmente após 24 h de administração. Observamos valores de 43.6 ± 5.8 e 100.6 ± 57.0 , e de 0.0 ± 0.0 e 11.8 ± 16.7 no número de infiltrados em animais inoculados com 20 ou 10 + 10 μ L de SA e de SAL respectivamente (Tabela 3A). Além disso, até 24 h, todos os grupos estudados (com exceção de um camundongo do grupo de 20 μ L de SA) apresentaram predominância de células polimorfonucleares (Figura 8). Após 48 h, há uma inversão desse perfil inflamatório, sendo (em todos os grupos) predominantemente mononuclear (Figura 8).

Os grupos SAL apresentaram níveis mais elevados de inflamação tecidual, a partir de 48 h de inoculação, sendo mantida até o último dia estudado (168 h), enquanto neste período mais tardio, a intensidade da lesão e o número de células inflamatórias apresentavam-se reduzidas nos grupos de SA (Figura 8, Tabela 3B). Com o objetivo de identificar a presença de eosinófilos, foi realizada coloração com Sirius red. A análise histopatológica (SA e SAL 20 μ L) demonstrou que após uma única administração, houve a migração de eosinófilos logo após 2 h de injeção, sendo em 24 horas mais elevada nos camundongos injetados com sangue em comparação com a intervenção SAL (21,5 e 7%, respectivamente) (Figura 9). Nossos resultados também revelaram que em um de cinco camundongos que receberam três administrações de 20 μ L de SA, um nível mais elevado (2,7 vezes) de células polimorfonucleares foi identificado em comparação a um dos três camundongos que receberam uma única administração de SA (Figura 9).

Além disso, a análise de citocinas por citometria de fluxo realizada em 2, 24, 48, 72 e 168 h após a administração, demonstrou um pico de IL-6 após 2h com a administração de SA, e de IL-10 após 24 h quando SAL foi administrada (Figura 7C).

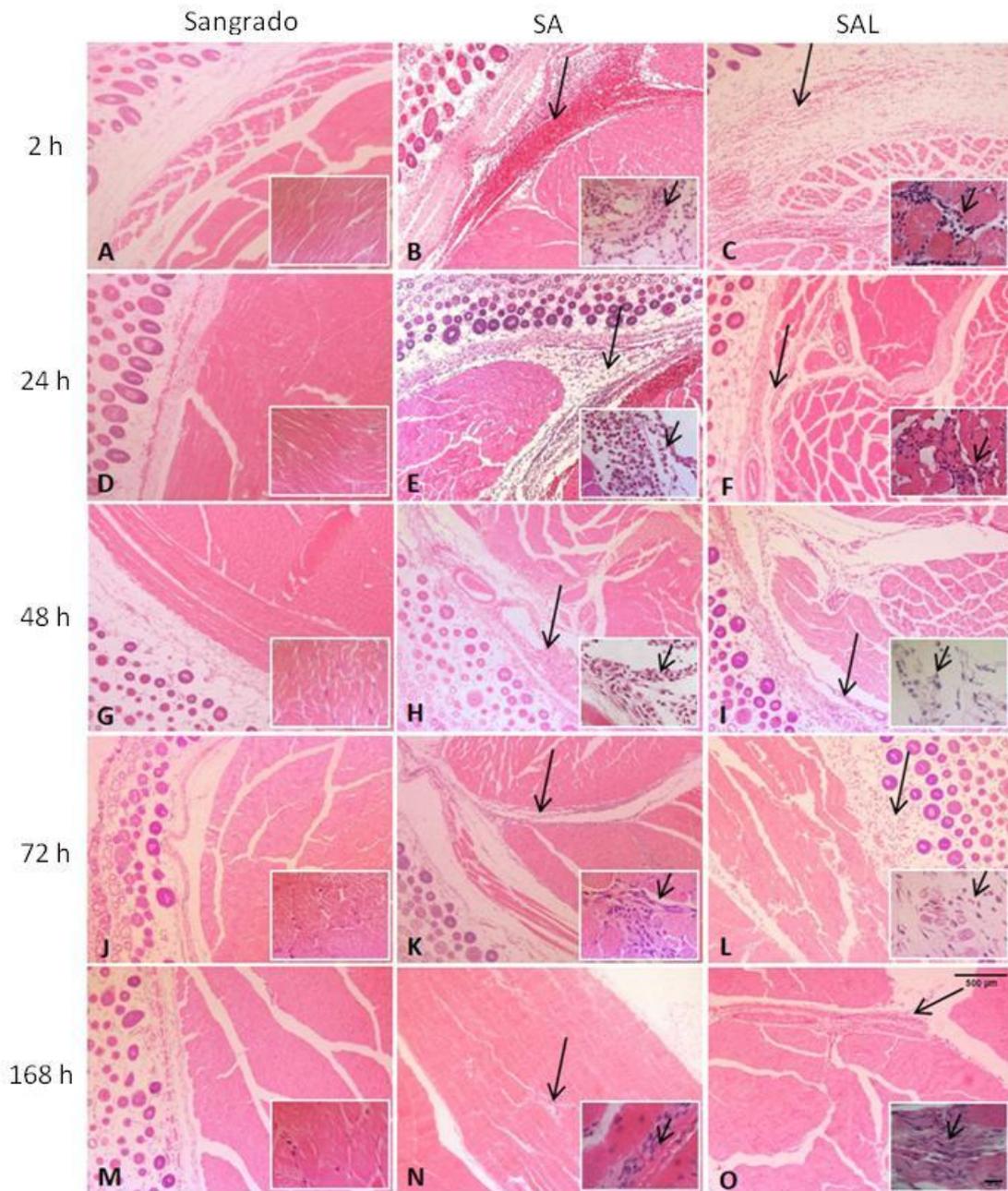
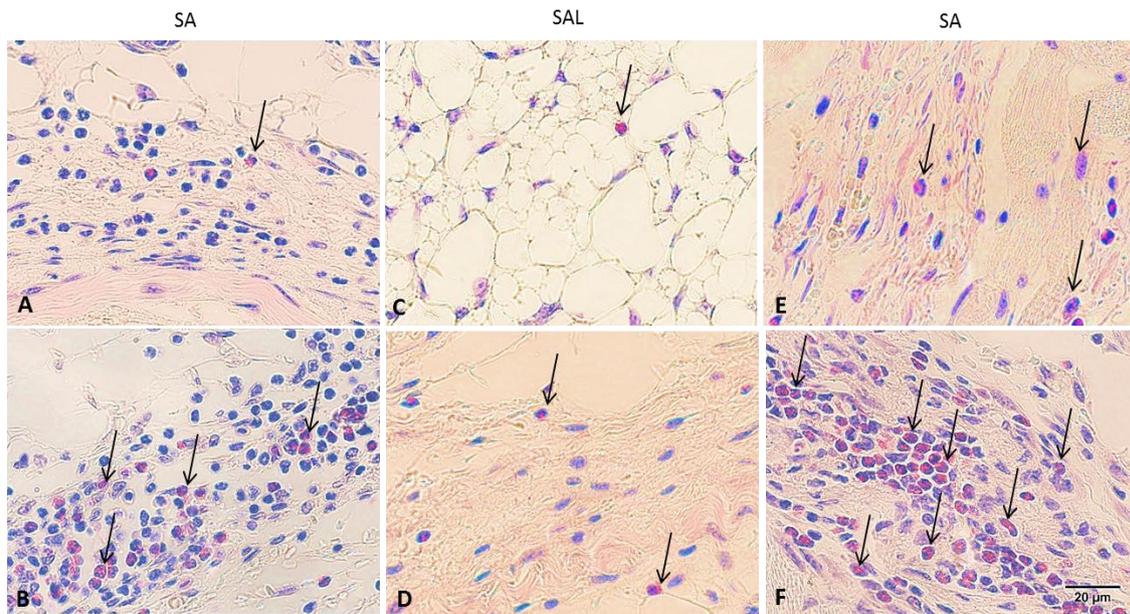


Figura 8. Análise histopatológica da presença de infiltrado inflamatório. Avaliação realizada pela coloração de hematoxilina-eosina, da região posterior do músculo do quadríceps, coletado de camundongos submetidos a única administração de SA e SAL (esquema 2). (A-O) Análise por microscopia óptica do número de células inflamatórias pela marcação (setas, A-O) de amostras de tecidos coletados de camundongos submetidos a um ciclo de SA (B, E, H, K e N) e SAL (C, F, I, L e 8) injeção (20 µL) e seguido após 2, 24, 48, 72 e 168 h de terapia. Magnificações originais $\times 100$ e $\times 1000$ (inset) para todos os painéis.



Percentual de eosinófilos (média \pm DP) determinado pela quantificação por microscopia óptica utilizando a coloração de Sirius Red a partir do músculo da coxa de camundongos submetidos a administração de SA ou SAL

Grupo	2 h	24 h	48 h	48* h
SA	4.3 \pm 3.2	21.5 \pm 2.1	18#	48#
G SAL	4.0#	7.0#	nd	nd

Figura 9. Análise histopatológica da presença de eosinófilos. A avaliação de amostras foi realizada no músculo quadríceps de camundongos submetidos à terapia com SA e SAL. (A-F) Análise ao microscópio óptico e (G) determinação do percentual de eosinófilos (média \pm DP) identificados pela cor rosa (setas, A-F) nas amostras de tecido coletadas de camundongos submetidos a um (A-E) ou três ciclos (F) de injeção de SA (A-B, E-F e G) e de SAL (C-D e G) (20 μ L) e seguidos de 2 (A, C e G), 24 (B, D e G) e 48* h G) após a terapia. Ampliação original \times 1000 para todos os painéis. # = análise individual.

5.2 Segundo bloco de estudos: análises em animais experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*

Nossa primeira abordagem foi a condução de protocolos de administração de SA em esquemas: (i) profilático (pré infecção) e terapêutico (pós infecção); (ii) utilizando em paralelo o tratamento com o fármaco de referência, o Bz (100 mg/kg) e, (iii) comparação entre o grupo infectado e não infectado, mas sem qualquer tipo de intervenção. Uma única administração de SA e Bz realizadas antes da inoculação do parasito demonstraram que apenas o fármaco de referência, administrado 2 h antes da infecção, foi capaz de reduzir significativamente (86%) o pico de parasitemia que corresponde ao 8º dpi neste modelo experimental (Figura 10A). Os grupos de SA apresentaram apenas pequenas alterações nos níveis de parasitemia, resultando em decréscimos de 29% e 18% nos tempos de 2 h e 24 h de administração prévia de SA, respectivamente, atingindo níveis semelhantes aos do Bz administrado antes de 24 h (Figura 10A e C). Apesar disso, apenas o grupo tratado com Bz 2 h antes da infecção foi capaz de conferir 20% de sobrevivência dos animais, enquanto todos os outros grupos de camundongos atingiram 100% de morte, à semelhança dos tratados com veículo de Bz (Figura 10B e D). Uma vez que foi observada pequena redução no pico de parasitemia quando os animais receberam uma única injeção de SA, o nosso próximo passo foi verificar se várias administrações poderiam promover um melhor efeito antiparasitário. Nesse sentido, administrações consecutivas de SA (três injeções em um intervalo de cinco dias entre cada uma) foram realizadas, sendo a última dose aplicada 24 h antes da infecção parasitária. Nossos dados mostraram que três administrações de SA levaram a resultados semelhantes aos encontrados com uma única administração de sangue, atingindo uma redução máxima de 24% no pico da parasitemia ($p \leq 0.05$) (Figura 10E) e, como também observado anteriormente, não foi capaz de proteger contra a mortalidade induzida pela infecção experimental (Figura 10F).

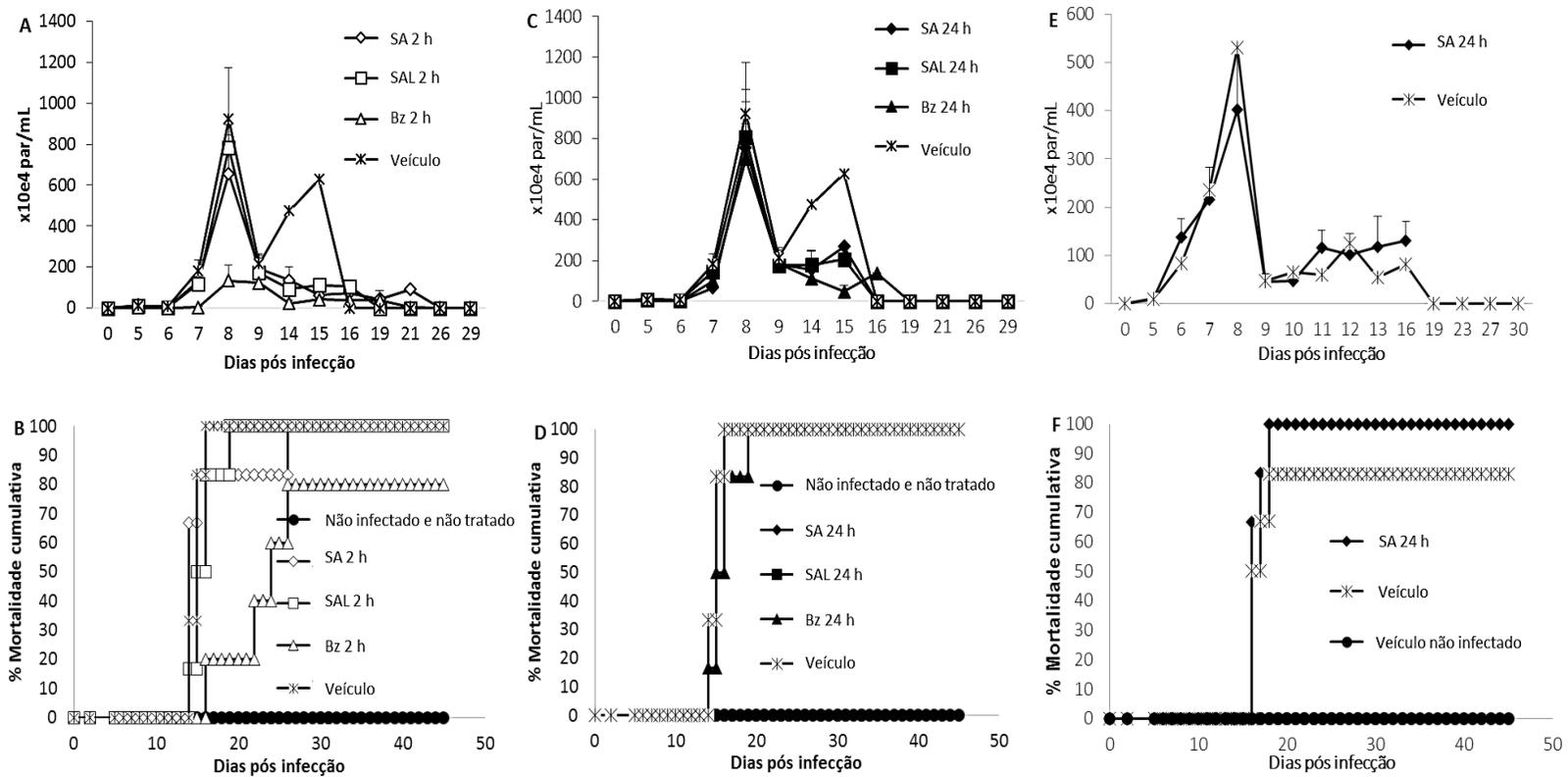


Figura 10. Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa. Efeito *in vivo* de administrações únicas (A-D) e três (intervalos de 5 dias entre cada dose) (E-F) de sangue autólogo total (SA), solução salina (SAL) e benznidazol (Bz) antes da infecção aguda de *T. cruzi* utilizando camundongos machos suíços inoculados com 10⁴ tripomastigotas sanguíneos (cepa Y). Os dados expressam níveis de parasitemia (A, C e E) e percentual de mortalidade cumulativa (B, D e F).

Paralelamente à avaliação do potencial de SA como possível abordagem profilática antiparasitária (seu uso antes da inoculação do parasito), também foi estudado o efeito desta prática pós-infecção *in vivo*. Nesta análise, administrações múltiplas e consecutivas (durante 5 ou 10 dias) de SA e SAL foram realizadas em animais infectados, iniciando a terapia com um protocolo preventivo (no 1º dpi) ou terapêutico (no 5º dpi, que representa o início da parasitemia neste modelo experimental) (Guedes et al., 2015). Em ambos os casos, não foi observado efeito significativo sobre os níveis de parasitemia (Figura 11A e C) e todos os animais morreram a partir do 14 dpi (Figura 11B e D). O tratamento com Bz foi único capaz de suprimir completamente a infecção (Figura 11A e C), além de proteger contra a mortalidade, dando 100% de sobrevida (Figura 9B e D). Buscando avaliar se a administração prolongada de SA poderia melhorar seu potencial efeito para a infecção experimental pelo *T. cruzi*, foi realizado outro conjunto de ensaios que estenderam o uso de SA durante 10 dias consecutivos. Os resultados mostraram que apenas a terapia de referência realizada com Bz foi capaz de suprimir a parasitemia e também induzir 100% de sobrevida dos camundongos (Figura 12A e B).

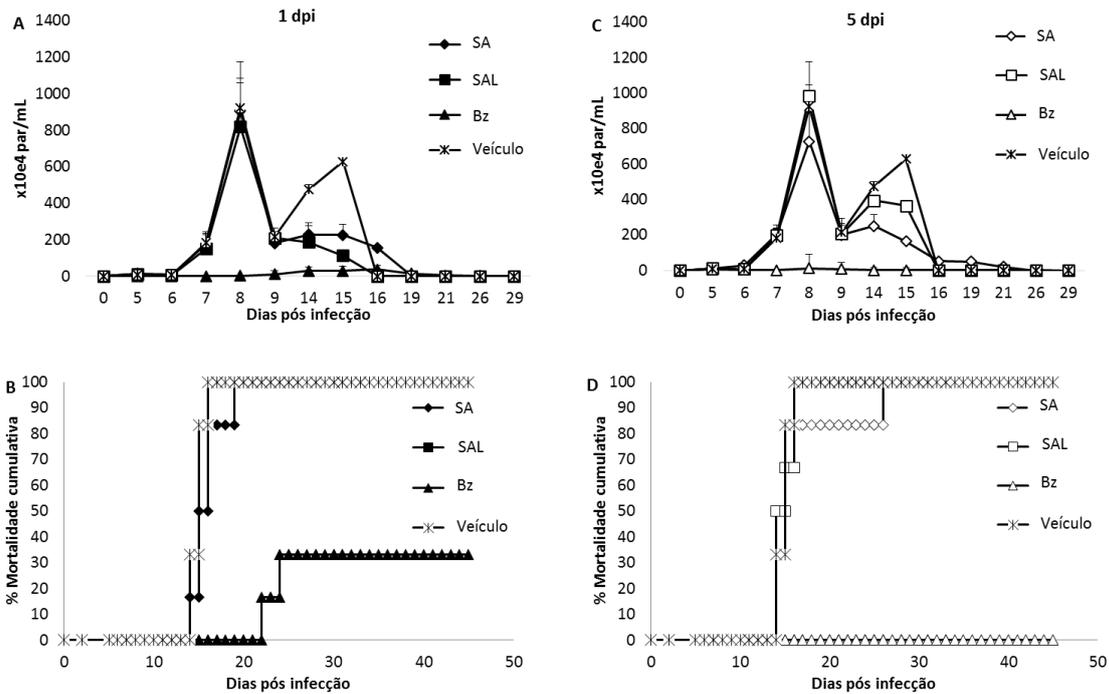


Figura 11. Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa. Efeito *in vivo* da administração sangue autólogo total (SA), saline (SAL) e benznidazol (Bz), por 5 dias consecutivos, após infecção aguda pelo *T. cruzi* utilizando camundongos suíços inoculados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos (cepa Y). A e C: níveis de parasitemia e B e D: percentual de mortalidade cumulativa. A terapia foi iniciada no 1^o dpi (A e B) e no início da parasitemia (5^o dpi – C e D). dpi = dias pós infecção.

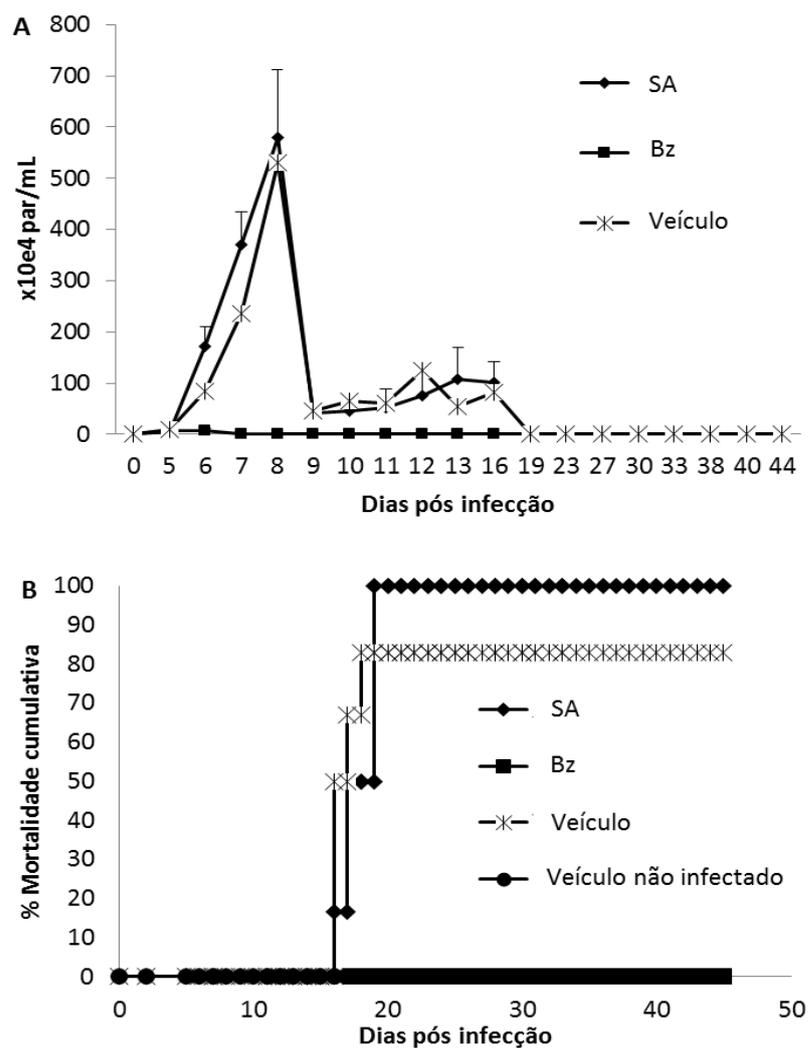


Figura 12. Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa. Efeito *in vivo* da administração de sangue autólogo (SA) e benznidazol (Bz), por 10 dias consecutivos, após a infecção aguda pelo *T. cruzi*, utilizando camundongos suíços machos inoculados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos (cepa Y). Parâmetros avaliados: níveis de parasitemia (A) e percentual de mortalidade cumulativa (B). A terapia foi aplicada no início da parasitemia (5^o dpi).

Por fim, como as análises prévias demonstraram níveis aumentados de IL-6 frente à administração de SA em animais não infectados, ensaios adicionais foram conduzidos utilizando-se camundongos infectados expostos ou não a SA e sangue heterólogo total (SH) e analisando o perfil de citocinas nestas condições experimentais. Como amostras controle, além de grupos de animais não infectados e não tratados, infectados e não tratados, não infectados e tratados com SA e infectados e tratados com Bz foram avaliados (Figuras 13-15, Tabela 3). Tanto o tratamento com SA quanto o com SH não conseguiram reduzir a parasitemia nem proteger os animais contra a mortalidade (Figura 13A-B), enquanto Bz (administrado no 5º e 9º dpi) reduziu completamente a parasitemia e protegeu contra a mortalidade dos camundongos.

A análise do perfil inflamatório foi realizada em amostras de plasma coletadas no 9º e 40º dpi (nos animais sobreviventes) (Tabela 4, Figuras 14 e 15). Nossos dados demonstraram alterações significativas apenas no pico de parasitemia aguda (correspondente ao 9º dpi) relacionado a elevados níveis de IFN-gama (5,500 vezes), TNF-alfa (754 vezes) e IL-6 (260.000 vezes) em camundongos infectados e não tratados em comparação com animais não infectados e não tratados (Tabela 4). Em relação aos grupos tratados, no 9º dpi, apenas os níveis de TNF-alfa do grupo tratado com Bz diminuíram significativamente ($p = 0.02$) em comparação com o grupo de camundongos infectados e não tratados (Tabela 4) no tempo de 9º dpi. Nenhuma diferença significativa foi identificada no tempo de 40º dpi em todos grupos testados exceto grupo Bz (Tabela 4).

Com relação à curva ponderal, exceto para os animais tratados com Bz pós-infecção, todos os animais infectados (não tratados e tratados com SA e SH) apresentaram perda de peso na segunda semana de infecção ($p < 0.05$).

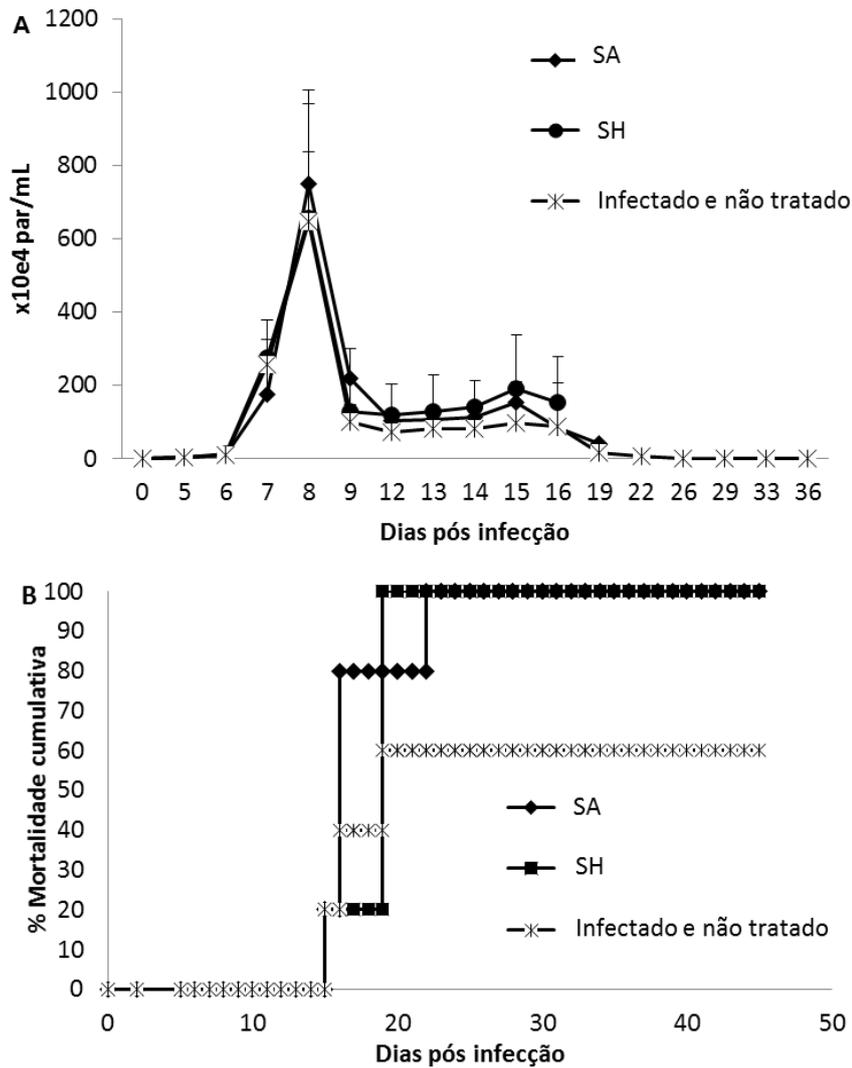


Figura 13. Análise dos níveis de parasitemia e percentual de mortalidade cumulativa. Efeito *in vivo* da administração de SA, SH e Bz 2 h antes da infecção aguda pelo *T. cruzi*, utilizando camundongos suíços machos inoculados com 10⁴ tripomastigotas sanguíneos (cepa Y), avaliado pelos níveis de parasitemia (A) e percentual de mortalidade cumulativa (B).

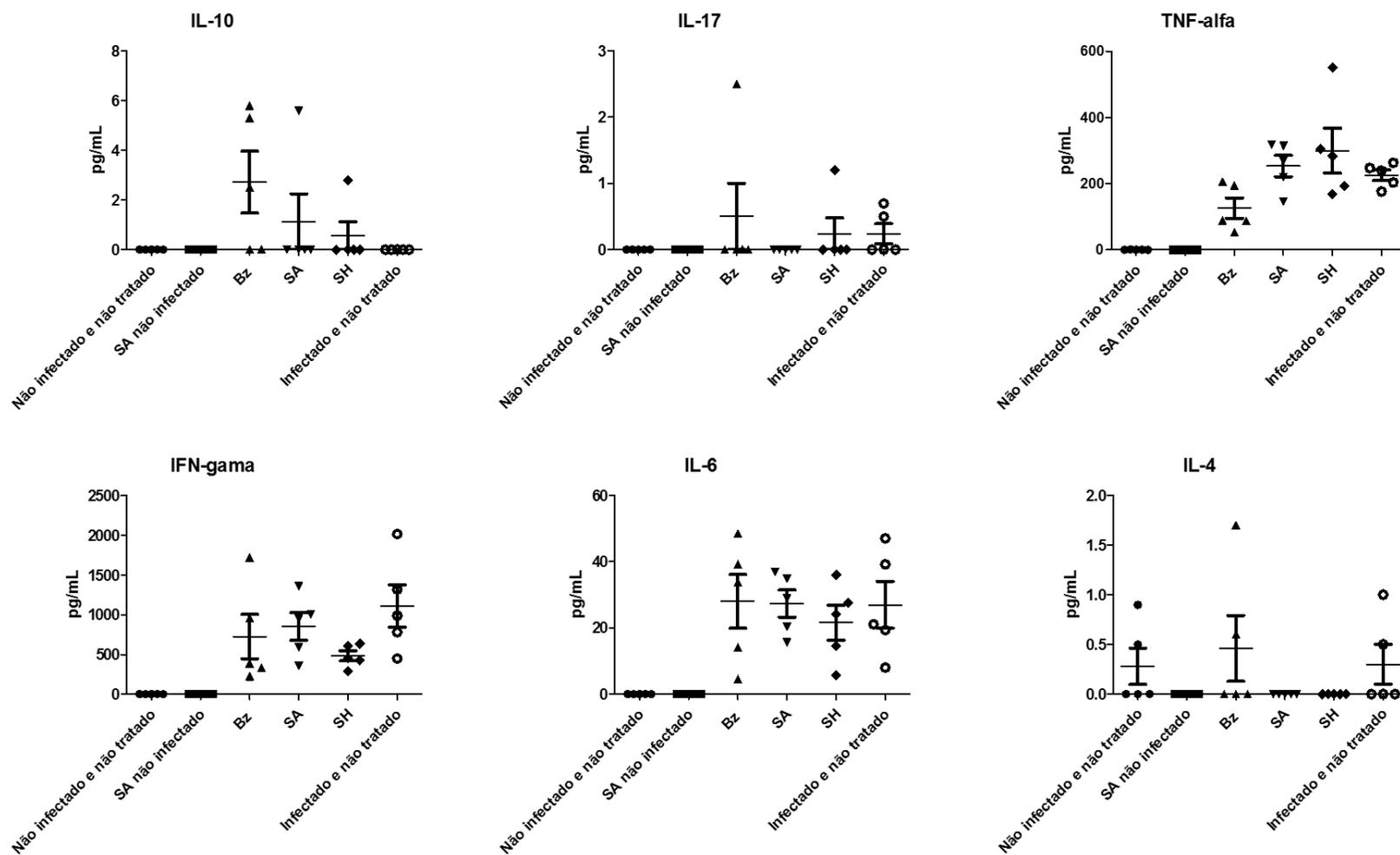


Figura 14. Análise do perfil de citocinas plasmáticas. Amostras de sangue foram coletadas no 9º dpi de camundongos submetidos a três administrações de SA ou SH (intervalo de cinco dias) previamente a infecção aguda pelo *T. cruzi*, ou Bz (5º e 9º dpi) utilizando camundongos inoculados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos.

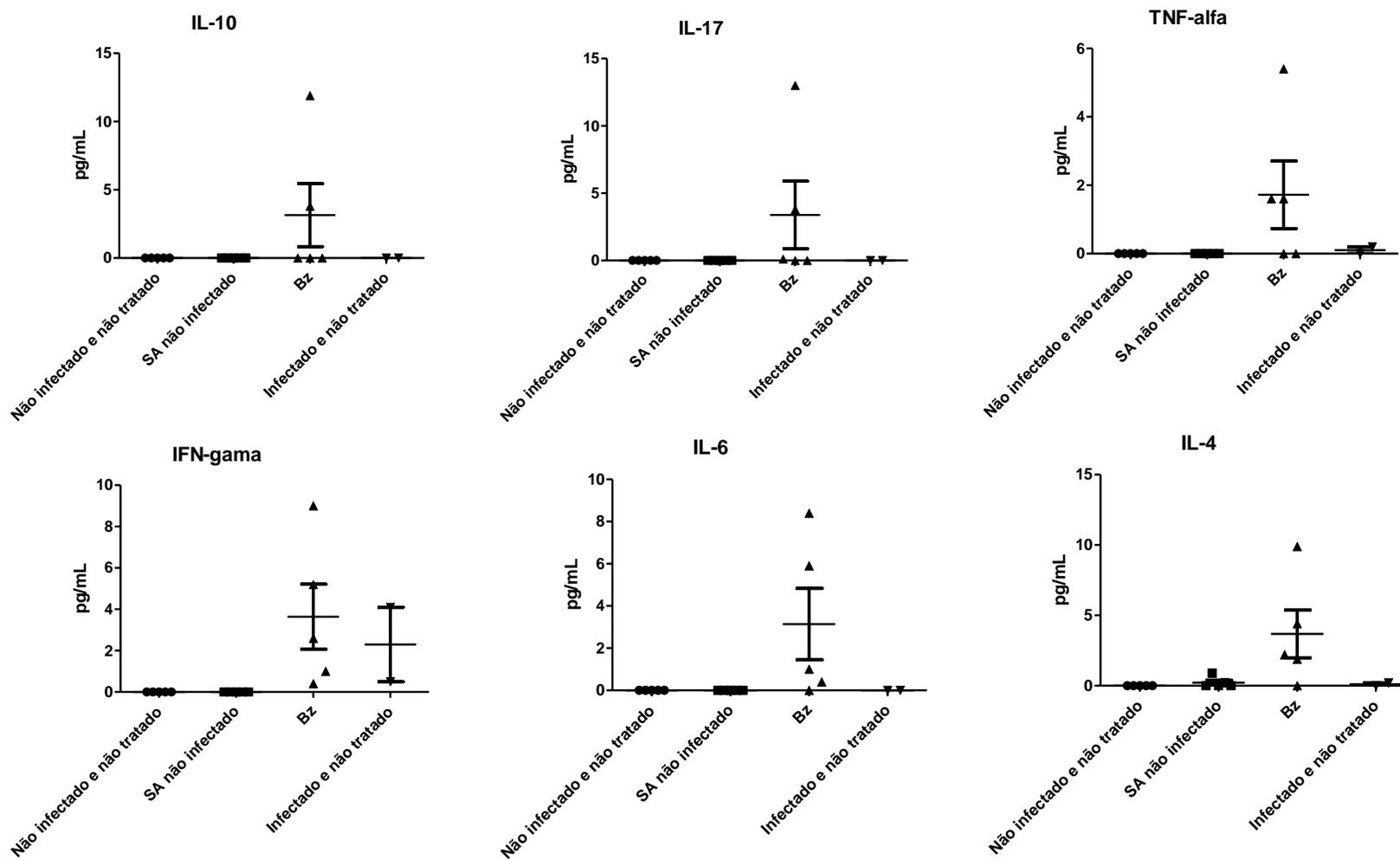


Figura 15. Análise do perfil de citocinas plasmáticas. Amostras de sangue coletadas no 40^o dpi de camundongos submetidos a três administrações de SA ou SH (intervalo de cinco dias) previamente a infecção aguda pelo *T. cruzi* ou Bz (5^o e 9^o dpi) utilizando camundongos inoculados com 10⁴ tripomastigotas sanguíneas.

Tabela 4. Média e DP dos perfis de citocinas de amostras de sangue de camundongos submetidos a três administrações de SA ou SH (intervalos de cinco dias) antes da infecção aguda por *T. cruzi* ou benznidazol (5º e 9º dpi) utilizando camundongos suíços machos inoculados com 10⁴ tripomastigotas sanguíneos (cepa Y).

Data de coleta	Grupo	IL-10 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	TNF (pg/mL)	IFN (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
9º dpi	Não infectado e não tratado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,7	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0
	SA não infectado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Bz	2,7 ± 2,8	0,5 ± 1,1	126,3 ± 69,4 *	724,5 ± 624,6	28,0 ± 18,2	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0
	SA	1,1 ± 2,5	0,0 ± 0,0	253,7 ± 72,0	851,8 ± 388,5	27,4 ± 9,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	SH	0,6 ± 1,3	0,2 ± 0,5	300,4 ± 152,0	482,3 ± 142,2	21,6 ± 11,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Infectado e não tratado	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3	226,3 ± 35,6	1110,1 ± 597,0	26,0 ± 15,9	0,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0
40º dpi	Não infectado e não tratado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	SA não infectado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
	Bz	3,1 ± 5,2	3,4 ± 5,6	1,7 ± 2,2	3,6 ± 3,5	3,2 ± 3,8	3,7 ± 3,8	0,0 ± 0,0
	Infectado e não tratado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	2,3 ± 2,6	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0

dpi= dias pós infecção; *ANOVA= $p \leq 0.05$ (n= 5) relacionado ao grupo infectado e não tratado

5 DISCUSSÃO

Apesar do uso de SA ser relatado há mais de um século como uma potencial prática médica alternativa/complementar em diferentes condições patológicas que acometem humanos e animais (tais como, rinites alérgicas, doenças autoimunes, osteoartrites, dermatites atópicas, e doenças infecciosas), este procedimento ainda representa uma questão controversa. A indefinição dessa prática é devido à falta de estudos pré-clínicos e clínicos multicêntricos controlados e detalhados para confirmar seu potencial efeito protetor, além de elucidar as bases imunológicas e moleculares que contribuam para o conhecimento do mecanismo de ação relacionado à sua aplicação (Domz et al., 1957; Bocci, 1994; Moura, 2006; Veríssimo e Katiki, 2007; Leite et al., 2008; Ibanes et al., 2013). Deste modo, a prescrição deste método de tratamento por médicos em humanos no Brasil foi proibida pela ANVISA, sendo portanto, realizado pelos seus defensores apenas de modo informal no país (Leite et al., 2008).

Neste sentido, nosso primeiro bloco de estudos visou investigar alguns aspectos clínicos, bioquímicos e histopatológicos frente à intervenção de SA utilizando modelo camundongo “outbred”. Nosso protocolo experimental seguiu os princípios de redução do número de animais e refinamento dos procedimentos, incluindo o uso de avaliações comportamentais não invasivas, tendo em vista que infelizmente não existem modelos substitutos para esta abordagem experimental. Nestes ensaios, diferentes esquemas de terapia foram empregados: (a) utilização de uma e três administrações via im consecutivas; (b) inoculação de dois diferentes volumes de sangue na mesma pata ou fracionando (10 + 10 μ L) em ambas as patas e, (c) comparação dos resultados com os grupos controles negativos (não sangrado e não injetado e sangrado, mas não injetado) e com os camundongos inoculados com solução salina. O volume máximo (20 μ L) foi baseado em ensaios anteriores em outros modelos animais como ratos (v/g massa animal não superior a 1mL/kg) (Ibanes et al., 2013), levando também em consideração uma proporção semelhante (v/v) descrita na literatura popular conduzidos em humanos e animais, além dos poucos ensaios clínicos (Olwin et al., 1997; Melo et al., 2010; Sandrey,

2014; Jeon et al., 2014; Davenport et al., 2015). Nossos achados com relação aos parâmetros comportamentais mostraram que, embora animais tratados com uma ou três injeções de SA ou salina não apresentaram alterações comportamentais significativas, em 20-40 % dos que receberam 20 µL de SA em uma única coxa (por três vezes) apresentaram alteração na marcha da pata injetada. Nossos dados corroboram com resultados em outro modelo experimental (rato), com administração de repetidas injeções intraarticulares de sangue autólogo e se sugere que estejam relacionados ao comprometimento da marcha, muito possivelmente devido à dor (Boettger et al., 2013). Neste estudo, durante um período de 50 dias, os animais foram injetados semanalmente em uma articulação do joelho com sangue total ou com componentes celulares/plasmáticos. Os resultados demonstraram hiperalgesia primária iniciada após a terceira injeção de amostras de sangue total, acompanhada de leve alteração funcional na marcha (Boettger et al., 2013). Os autores discutiram que este efeito colateral foi mais proeminente em animais injetados com sangue total em comparação com a injeção de plasma e, portanto, o efeito das células poderia ser aditivo para promover a dor. Além disso, relataram que os animais que receberam sangue total apenas uma vez, não exibiram alterações de marcha (Boettger et al., 2013), corroborando nossos presentes dados realizados em modelo murino. Nos ensaios clínicos, a queixa mais frequente dos pacientes, após a injeção intraarticular de plasma rico em plaquetas (PRP), foi dor no local da injeção, tendo duração média de até 10 minutos após a injeção, diminuindo gradualmente, porém em alguns pacientes perdurou até 2 semanas (Rayegani et al., 2014). Com exceção do comprometimento da marcha, nenhum outro efeito colateral significativo foi observado, incluindo ausência de alteração relevante na análise bioquímica e no tamanho e patologia macroscópica dos órgãos estudados (coração, fígado, baço e rins). Adicionalmente, visando ainda reduzir a possibilidade do impacto do calibre da agulha utilizada na inoculação de SA (embora no grupo SAL não tenhamos observado comprometimento da marcha com semelhante volume de administração), a partir do ensaio 3, foi utilizada agulha de menor calibre (conforme descrito em material e métodos).

Com relação à análise bioquímica e hemograma, observamos que 48 h após a terceira administração de SA, os valores de leucócitos e eritrócitos foram inferiores ($p \leq 0.05$) em todos os grupos submetidos a qualquer tipo de intervenção de sangramento em comparação com o controle não sangrado e não tratado. De acordo com Lapchik et al. (2009), em modelos de camundongos, embora a recomposição do volume sanguíneo possa ser observada 24 h pós a coleta de sangue, o número de eritrócitos só é completamente restaurado, após cerca de duas semanas. Ainda com relação a análise do hemograma, observamos que as taxas de plaquetas foram inferiores quando utilizamos três intervenções, o que pode sugerir um maior recrutamento destes elementos para os sítios de lesão/inflamação quando há maiores danos induzidos pelas consecutivas injeções (três injeções de SA). Também, como demonstrado em estudos anteriores utilizando a mesma relação de v/g em modelo de rato (Ibanes et al., 2013), o uso de SA não afetou a oxigenação sanguínea, uma vez que não foi observada cianose nem alterações nos níveis de hemoglobina dosados no sangue periféricos dos animais tratados com esta metodologia. Em outros modelos experimentais, embora Ottobelli et al. (2016) demonstrarem que este procedimento não tenha influência nos níveis de leucócitos, outros estudos mostram em ratos Wistar um aumento nos percentuais de leucócitos após dois dias de administração de SA (Silva et al., 2009).

Estudo prévio em modelos murino revelou que SA administrado pela via intravenosa como formulação de vacina (células de sangue total carregadas com RNAm), resultou na sua biodistribuição em múltiplos órgãos, incluindo o fígado e baço (Phua et al., 2014). Devido à utilização de diferentes vias, não podemos afirmar que uma biodistribuição semelhante tenha ocorrido em nossos experimentos presentemente conduzidos via im. Contudo, uma intensa infiltração de células inflamatórias foi deflagrada pelo SA no local da injeção 2 h depois da administração im, sendo mais forte e mais precoce em comparação com a administração de solução salina. Paralelamente, detectamos nos animais injetados com SA um rápido aumento dos níveis de IL-6 (2 h pós injeção). IL-6 é um mediador pró-inflamatório que atua como ativador sistêmico de proteínas de fase aguda, além de diversas linhas de evidências sugerirem

seu papel fundamental durante a transição da resposta imune inata para a adquirida (Scheller et al., 2011; Hunter et al., 2015). Após 24 h, os animais tratados com SAL apresentaram aumento nos níveis de IL-10, um mediador com potentes propriedades anti-inflamatórias, sendo essencial na manutenção da homeostase e prevenção de danos nos tecidos de hospedeiros durante o processo inflamatório, causado por infecções ou lesões (Saraiva e O'Garra, 2010; Iyer e Cheng, 2012). Diferentes hipóteses poderiam ser levantadas para explicar a intensa resposta inflamatória presente no local da injeção, incluindo o próprio volume administrado, uma vez que o grupo SAL também apresentou intensa presença de infiltrados inflamatórios. Um dado histopatológico identificado no nosso modelo murino foi o rápido reparo tecidual *in situ* uma semana após a última administração de SA. Também observamos que embora houvesse um intenso perfil inflamatório no sítio de inoculação de SA em camundongos de ambos os grupos tratados (uma única vez ou sob repetidas administrações de SA - três doses), maiores níveis de eosinófilos (corado por Sirius red) foram detectados em um camundongo que recebeu três injeções em relação aos animais que receberam inóculo único. O grau de lesões e inflamação foram também diretamente relacionados ao volume aplicado de SAL e SA, sendo maiores nos grupos que receberam 20 μ L.

Ensaio clínico randomizado foram realizados utilizando a injeção intraarticular de PRP para tratar patologias progressivas crônicas, tais como, a osteoartrite visando avaliar a contribuição desta terapia complementar na regulação de sinais anti-inflamatórios e equilíbrio da angiogênese (Rayegani et al., 2014). Nestes pacientes que sofrem de artrite de joelho, a administração de injeções únicas ou duplas de PRP resultaram em benefícios clínicos semelhantes, exibindo melhores efeitos quando comparados com injeção de solução salina (Rayegani et al., 2014). O uso do PRP também vem sendo amplamente empregado no tratamento de diferentes lesões decorrentes da execução de esportes por atletas. A única administração de PRP no ligamento tibiofibular inferior anterior em atletas de "rugby", que apresentaram lesão de sindesmo do tornozelo, contribuiu para que o tempo de retorno ao jogo fosse significativamente menor no grupo de intervenção ($p = 0.048$), apresentando maior agilidade ($p = 0.002$) e salto vertical ($p = 0.001$) comparado à coortes

históricas que receberam tratamentos convencionais (Samra et al., 2015). Rossi e colaboradores (2016) também demonstram que a única aplicação intralesional de PRP associado ao programa de reabilitação em atletas que apresentavam lesões musculares reduziu o tempo de retorno aos esportes em comparação aos pacientes que foram submetidos somente ao programa de reabilitação ($p = 0.001$). Porém, a taxa de recorrência não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Rossi et al., 2016).

Muito pouco se sabe sobre os possíveis mecanismos de ação do SA e PRP e é possível que seus efeitos estejam relacionados as plaquetas e aos leucócitos. As plaquetas têm papel importante durante os processos inflamatórios, interagindo com leucócitos e células endoteliais e, além disso, promovem a formação do coágulo sanguíneo (Grotto, 2009). O papel não somente das plaquetas mas também dos monócitos, bem como das células estaminais presentes nas amostras de SA e PRP, tem sido alvo de discussão. Foi proposto que a liberação (por leucócitos) de proteases e de metabólitos reativos de oxigênio poderia agravar condições patológicas crônicas, enquanto outros autores sugerem que a produção de citocinas e enzimas poderia contribuir positivamente nos processos de reparação, ativação plaquetária, prolongamento da liberação de fator de crescimento e prevenção de infecções (revisto em Grotto, 2009).

Como descrito acima, um intenso infiltrado inflamatório estava presente em todos os grupos presentemente estudados, exceto nos grupos controle conduzidos com animais que não receberam qualquer tipo de intervenção ou que foram apenas sangrados. Na administração de sangue e salina, observou-se uma infiltração predominantemente polimorfonuclear até o tempo de 24 h sendo então, após 48 h, substituída por células mononucleares. A presença de macrófagos no local da administração de SA ou SAL poderia ter impacto em diversas propriedades biológicas, incluindo regulação da atividade mitótica das células satélites, dando origem a novas fibras musculares e, além disso, levando à liberação de fatores de crescimento (Ferrari et al., 2005; Tidball, 2005). Assim, o conjunto dos nossos resultados precisa ser mais profundamente explorado visando melhor discriminar o contexto inflamatório diferencial de SA e SAL e seus potenciais eventos modulatórios.

No campo de patologias causadas por agentes infecciosos, poucos dados estão disponíveis. Alguns estudos sugerem que uso de SA possa induzir proteção sobre infecções virais contribuindo para rápida melhora do quadro clínico em pacientes (Owin et al., 1997) e animais (Santin & Britto, 2004). Outros autores já não observaram efeito protetor de SA sobre infecção canina com *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* quando utilizado em associação com antibióticos (Melo et al., 2010). Nesse contexto, nosso segundo bloco de estudos teve como objetivo investigar o potencial impacto da administração de SA no curso de uma patologia parasitária utilizando um modelo de infecção aguda induzida pelo *Trypanosoma cruzi*. O nifurtimox e benznidazol são os únicos fármacos disponíveis para tratar a doença e foram introduzidos na clínica médica há mais de quatro décadas. Além da toxicidade significativa destes fármacos, que leva à interrupção do tratamento em muitos pacientes, ambos compostos são eficazes apenas para a fase aguda da infecção. Por isso, é urgentemente necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possam substituir ou mesmo complementar o atual tratamento (Pinazo et al., 2010; Chatelain, 2015).

A fim de verificar se a administração intramuscular de SA poderia impactar no curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*, conduzimos ensaios explorando diferentes esquemas profiláticos (antes da infecção) e terapêuticos (pós infecção) realizados em diferentes períodos de administração de SA (de um até 10 dias), comparando com os dados obtidos com administração de sangue heterólogo (SH) e avaliando o perfil de mediadores no plasma de animais não tratados e tratados. Em paralelo, animais foram tratados com o fármaco de referência, o Bz. A soma dos nossos resultados demonstrou que frente a administração de SA, em todos os regimes estudados, somente observamos discretos decréscimos (<30%) nos níveis parasitemicos. É possível que esta modesta diminuição da parasitemia (18-29%) possa estar relacionada a ativação de uma resposta de fase aguda mediada por IL-6 tendo em vista os dados observados no nosso estudo anterior em animais saudáveis. Como a IL-6 é um mediador pró-inflamatório que atua como ativador sistêmico de proteínas de fase aguda, esta poderia desempenhar um papel na redução parcial da carga parasitária em animais expostos ao SA. Por outro lado, nosso

controle terapêutico positivo com o medicamento de referência (Bz) foi capaz, (como esperado pelo uso em sua dose ótima de 100mg/kg) de suprimir totalmente a carga parasitária sanguínea, protegendo ainda contra mortalidade induzida por esta infecção parasitária. SA e SH (doses únicas e múltiplas) administrados antes e depois da infecção parasitária não aumentaram a sobrevivência dos animais, apresentando níveis de mortalidade semelhantes aos animais infectados e não tratados e animais infectados e tratados com veículo. Quando o painel de citocinas foi avaliado, verificou-se que após 9 dias de infecção, os níveis de IFN-gama, TNF-alfa e IL-6 estavam mais elevados em todos os grupos de animais infectados (exceto os infectados e tratados com Bz) em comparação com camundongos não infectados. O grupo tratado com Bz apresentou valores estatisticamente menores ($p = 0,02$) de TNF-alfa em relação aos animais infectados e não tratados, possivelmente devido aos subpatentes níveis de parasitismo residual e resultante diminuição do estímulo parasitário antigênico. Nossos resultados corroboram estudos prévios utilizando modelos murino de infecção aguda pelo *T. cruzi* que exibiram elevados níveis plasmáticos de IFN-gama, TNF-alfa e IL-6 em animais infectados e não tratados em comparação com animais não infectados, sendo reduzidos frente a terapia com Bz (Santos et al., 2015). Quanto à curva ponderal, apenas os animais tratados com Bz após a infecção mostraram proteção contra a perda de peso, enquanto os demais grupos infectados apresentaram diminuição nos valores a partir da segunda semana de infecção. Nossos dados também confirmaram a análise anterior usando o mesmo modelo experimental onde a terapia com Bz recuperou o peso ponderal nestes modelos experimentais (Soeiro et al., 2013).

Os dados disponíveis na literatura sobre potencial impacto de SA frente a infecções são escassos. Mettenleiter (1936) e Teixeira (1940) sugerem que o SA (única dose) pode atuar como intervenção profilática, especialmente na prevenção de complicações pulmonares pós-operatórias em pacientes submetidos a diferentes procedimentos cirúrgicos. O uso de PRP tem sido avaliado como procedimento de suporte devido à presença de fatores de crescimento e outras biomoléculas que podem promover atividade microbicida endógena. Um estudo recente que utilizou PRP na pele suturada de pacientes

com cirurgia no pé ou no tornozelo demonstrou que este procedimento não foi capaz de reduzir a incidência de infecção pós-operatória (SanGiovanni & Kiebzak, 2016).

Os resultados obtidos na presente dissertação revelaram que o uso de sangue autólogo no modelo de infecção aguda por *T. cruzi* não foi capaz de reduzir a carga parasitária de camundongos infectados, proporcionando apenas ligeiras reduções nos níveis de parasitemia (até 30%), mas sem proteção contra a mortalidade animal. Neste sentido, é importante investigar esta prática de forma mais aprofundada para melhor compreender o papel e potencial uso complementar de SA para terapias clínicas microbidas.

6 CONCLUSÕES

a) A administração de SA pela via intramuscular em camundongos saudáveis induziu alteração da marcha em 20-40% dos animais que receberam 20 µL de SA, muito provavelmente pelo número de administrações, sendo menos provável que ocorresse pela lesão induzida pelo calibre da agulha empregada tendo em vista ausência de alterações no grupo SAL;

b) Análises histopatológicas revelaram que o tratamento com SA em animais saudáveis, assim como o uso de solução salina são capazes de promover intenso recrutamento de células inflamatórias para o sítio de administração. Este infiltrado foi caracterizado por um predomínio de polimorfonucleares até 24 h após injeção, seguido da presença majoritária de células mononucleares no período de 48-168 h, corroborando com a cinética de recrutamento/natureza de células inflamatórias já estabelecidas na literatura corrente durante a resposta inflamatória aguda;

c) O uso de SA revelou a presença de infiltrado inflamatório mais intenso após 24 h da injeção, assim com a detecção de aumento nos níveis de IL-6 após 2h, enquanto o uso de solução salina apresentou um pico de células inflamatórias mais tardio (48-168 h), revelando aumento na detecção de IL-10 após 24 h de administração, sugerindo que estes diferentes estímulos possam direcionar distintas respostas inflamatórias e que merecem ser mais exploradas;

d) Apesar da ligeira redução (<30%) na carga parasitária de camundongos no curso da infecção aguda experimental causada pelo *T. cruzi* com administração de SA previamente à infecção, esta não foi capaz de proteger os animais contra a mortalidade;

e) Somente a terapia com o fármaco de referência (Bz), inclusive no esquema de pré-tratamento 2 h antes da infecção, foi capaz de suprimir a parasitemia e conferir a sobrevivência dos animais, confirmando sua ação antiparasitária;

f) Nossos dados suportam a necessidade de investigações mais aprofundadas do uso de SA para melhor compreensão dos mecanismos

envolvidos em sua administração frente à enfermidades de diversas origens, incluindo as infecções parasitárias, visando avaliar seu potencial benefício ou não como suporte complementar em terapias clínicas e veterinárias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2012.

Akpunar D, Bebis H, Yavan T. Use of complementary and alternative medicine in patients with gynecologic cancer: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16:7847-52.

ANVISA, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Auto hemoterapia: Nota Técnica nº 01 de 2007, disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> – acessado em 19/09/16.

Ardigo S, Herrmann FR, Moret V, Déramé L, Giannelli S, Gold G, Pautex S. Hypnosis can reduce pain in hospitalized older patients: a randomized controlled study. *BMC Geriatr.* 2016; 16:14.

Arnalich F, Rodriguez AE, Luque-Rio A, Alio JL. Solid platelet rich plasma in corneal surgery. *Ophthalmol Ther.* 2016; 5:31-45.

Bambo O, Cardoso JMM, Dimande A, Santos IFC. Auto-hemoterapia no tratamento da papilomatose oral canina – Relato de caso. *Medvep Dermatol - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária.* 2012; 2:39-43.

Barnes PM, Bloom B. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007.” *National Health Statistics Reports.* 2008; 12:1-24.

Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde N. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 2940–2952.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994; 15:74-80.

Bern C, Martin DL, Gilman RH. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol*, 2011; 75: 19-47.

Bern C. Chagas Disease. *N Engl J Med*, 2015; 373:1882.

Bernardes LS, Kato MJ, Albuquerque S, Carvalho I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorg Med Chem*, 2006; 14:7075-82.

Bocci V. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohaemotherapy). How 'inflammatory' cytokines may have a therapeutic role. *Mediators Inflamm*, 1994; 3:315-21.

Boettger MK, Krucker S, Gajda M, Schaible HG, Hilberg T. Repeated autologous intraarticular blood injections as an animal model for joint pain in haemophilic arthropathy. *Arthritis Res Ther*, 2013; 15:R148.

Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med*, 2008; 8:510-8.

Borrelli E, Diadori A, Zalaffi A, Bocci V. Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study. *Int J Ophthalmol*, 2012; 5:708-13.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, 1962; 4:389–396.

Brulé D, Gillmeister B, Lee M, Alexander S, Gassas A, Hendershot E, Zupanec S, Dupuis L, Sung L. A feasibility pilot trial of individualized homeopathic treatment of fatigue in children receiving chemotherapy. *Integr Cancer Ther*, 2015; 15:495-501.

Cabrales LB, Ciria HC, Bruzón RP, Quevedo MS, Aldana RH, De Oca LM, Salas MF, Peña OG. Electrochemical treatment of mouse Ehrlich tumor with direct electric current. *Bioelectromagnetics*, 2001; 22:316-22.

Carod-Artal, FJ; Gascon, J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol*, 2010; 9:533-42.

Cassiani SHB, Rangel SM. Complicações locais pós-injeções intramusculares em adultos: revisão bibliográfica. *Medicina*, 1999, 32: 444-450.

CDC, 2016. Centers for disease control and prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>, acessado 04/10/2016.

CDC, 2013. Centers for disease control and prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>, acessado em 16/05/2016.

Cerisola JA. Chemotherapy of Chagas' infection in man. *Scientific Publication PAH*, 1977; 347:35–47.

Chagas, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1909; 1: 159–218.

Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Devel Ther*, 2015; 9: 4807–4823.

Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen*, 2015; 20:22-35.

Chibwana AI, Mathanga DP, Chinkhumba J, Campbell CH Jr. Socio-cultural predictors of health-seeking behaviour for febrile under-five children in Mwanza-Neno district, Malawi. *Malar J*, 2009; 8:219.

Ching S, Ramachandran V, Gew LT, Lim SM, Sulaiman WA, Foo YL, Zakaria ZA, Samsudin NH, Lau PC, Veetil SK, Hoo F. Complementary alternative medicine use among patients with dengue fever in the hospital setting: a cross-sectional study in Malaysia. *BMC Complement Altern Med*, 2016; 16:37.

Chou CK, McDougall JA, Ahn C, Vora N. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics*, 1997; 18:14-24.

Corral JE, Kataria R, Vickers D, Koutouby R, Moshiree B. Biofeedback therapy for chronic constipation in a patient with Prader-Willi syndrome. *Ann Gastroenterol*, 2015; 28:502-5.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*, 2010; 115: 5-13.

Coura, JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015; 110:277-82.

Cruvinel, WM, Mesquita Júnior, D, Araújo, JAP; Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade, LEC. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, 2010; 50: 434-447.

Davenport KL, Campos JS, Nguyen J, Saboeiro G, Adler RS, Moley PJ. Ultrasound-guided intratendinous injections with platelet-rich plasma or autologous whole blood for treatment of proximal hamstring tendinopathy: a double-blind randomized controlled trial. *J Ultrasound Med*, 2015; 34:1455-63.

Da Silva CF, Batista Dda G, Oliveira GM, de Souza EM, Hammer ER, da Silva PB, Daliry A, Araujo JS, Britto C, Rodrigues AC, Liu Z, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro Mde N. In vitro and in vivo investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form—DB1965—against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One*, 2012; 7:e30356.

De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Curr Pharm Des*, 2002; 8:269-85.

De Souza, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res*, 2002; 88:1013-25.

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol*, 2010; 2010. pii: 295394.

Dias JCP. Human Chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. *J Trop Med*, 2013; 2013:789758.

Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ (1988) Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 1988; 44:880-1.

DoCampo R, Moreno SNJ. Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed Proceed, 1986; 45:2471-2476.

Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (platelet-rich plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. Muscles Ligaments Tendons J, 2014; 4:3–9.

DNDi, 2016. Drugs for neglected diseases initiative. <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas.html>, acessado em 10/05/2016.

DNDi, 2016. Drugs for neglected diseases initiative. <http://www.dndi.org/treatments/paediatricbenz.html>, acessado em 14/06/2016.

DNDi, 2016. Drugs for neglected diseases initiative. <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>, acessado em 11/05/2016.

Domz CA, Fay KJ, Hoag CL. Hemotherapy in suspected dermatomyositis. Calif Med, 1957; 87:108–111.

Drumond, KO. Autohemoterapia, vincristina e associação dos dois tratamentos no tumor venéreo transmissível canino. 2009. 82f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

Eckersall, PD, Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine - review. Vet J, 2010; 185:23-7.

Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC.. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey. JAMA, 1998; 280:1569–75.4

Fader RR, Mitchell JJ, Traub S, Nichols R, Roper M, Dan OM, McCarty EC. Platelet-rich plasma treatment improves outcomes for chronic proximal hamstring injuries in an athletic population. Muscles, Ligaments and Tendons J, 2015; 4:461–466.

Faustini A, Capobianchi MR, Martinelli M, Abbate I, Cappiello G, Perucci CA. A cluster of hepatitis C virus infections associated with ozone-enriched transfusion of autologous blood in Rome, Italy. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005; 26:762–7.

Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioterapia em Movimento*, 2005; 18: 63-71.

Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma intraarticular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc*, 2011; 19:528–535.

Foglieni C, Fulgenzi A, Belloni D, Sciorati C, Ferrero E, Ferrero ME. Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy. *BMC Nephrol*, 2011; 12:61.

Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*, 2002; 99:4160-5.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ, van Dijk E, Melen RH. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochem*, 2006; 108:229-32.

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, da Silva CF, Meuser MB, Simões-Silva MR, de Araújo JS, Ferreira CG, Moreira OC, Britto C, Lepesheva GI, Soeiro Mde N. Different therapeutic outcomes of benzimidazole and VNI treatments in different genders in mouse experimental models of *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015; 59:7564-70.

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, Meuser MB, Fulco TO, Araújo JS, Da Silva PB, Da Silva CF, Patrick DA, Bakunova SM, Bakunov AS, Tidwell RR, Oliveira GM, Britto C, Moreira OC, Soeiro MN. In vitro and In vivo Trypanosomicidal Action of Novel Arylimidamides Against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016; 60:2425-34.

Grotto HZW. Interpretação clínica do Hemograma. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 160p.

Harris PE, Cooper KL, Relton C, Thomas KJ. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use by the general population: a systematic review and update. *Int J Clin Pract*, 2012; 66:924-39.

Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015 May;16:448-57.

Ibanes AS, Cabral M, Abreu LC, Valenti VE, Gáscon TM, Moreira APF, Feder D, Azzalis LA, Junqueira VBC, Pereira EC, Marsicano SR, Perazzo FF, Fonseca FLA. Effects of autohemotherapy on hematological responses in Wistar female rats Autohemotherapy in rats. *HealthMED*, 2013; 7: 1256-61.

Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clin Infect Dis*, 2010; 51: e69-e75.

James SL, Ali K, Pocock C, Robertson C, Walter J, Bell J, Connell D. Ultrasound guided dry needling and autologous blood injection for patellar tendinosis. *Br J Sports Med*, 2007; 41:518-21.

Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007; 102 Suppl 1: 95-7.

Jeon IK, On HR, Oh SH, Hann SK. Three cases of pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy (PUPPP) treated with intramuscular injection of autologous whole blood. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015; 29:797-800.

Kemper KJ, Vohra S, Walls R; Task Force on Complementary and Alternative Medicine; Provisional Section on Complementary, Holistic, and Integrative Medicine. American Academy of Pediatrics. The use of complementary and alternative medicine in pediatrics. *Pediatrics*, 2008 122:1374-86.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 2010; 8: e1000412.

Koyasu S, Moro K. Role of innate lymphocytes in infection and inflammation. *Front Immunol*, 2012; 3:101.

Leite DF, Barbosa PFT, Garrafa V. Auto-Hemoterapia, intervenção do estado e bioética. *Rev Assoc Med Bras*, 2008; 54:183-8.

Lerman RH. The macrobiotic diet in chronic disease. *Nutr Clin Pract*, 2010; 25(6):621-6.

Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM. Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu, 2009. 708p.

Llewellyn BD. An improved Sirius red method for amyloid. *J Med Lab Technol*, 1970; 27:308-9.

Magesh DP, Kumaravelu C, Maheshwari GU. Efficacy of PRP in the reconstruction of mandibular segmental defects using iliac bone grafts. *J Maxillofac Oral Surg*, 2013; 12:160-7.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 2007; 115: 1109- 1123.

Mejia MA, Bradley JP. The effects of platelet-rich plasma on muscle: basic science and clinical application. *Oper Tech Sports Med*. 2011;19:149–153.

Meirelles MN, de Araújo Jorge TC, de Souza W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Z Parasitenkd*, 1982; 68:7–14.

Melo TB, Faustino MAG, Teixeira MN, Neto JHF, Ramos RAN, Ferreira MA, Andrade LSS. Auto-hemoterapia no tratamento de cães acometidos de hemoparasitoses. In: X Jornada de ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX. 2010, Recife. Anais... Recife: UFRPE, 2010. Disponível em: http://api.ning.com/files/KekLi78laTierWWRVzsPnXf1lpwpWlwdhWdJuSKZyI51M-HJBgsRy0HWAI1VTYvuDdEvMVUrxmIj7kDvnGyF4luy9J*tmSDm/AHT_trat_caes_R14591.PDF.

Mendonça Caridad JJ, Platas F Jr. Fibrous dysplasia of the mandible: Surgical treatment with platelet-rich plasma and a corticocancellous iliac crest graft-report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008; 105:e12-8.

Mettenleiter MW. Auto-hemotransfusão como prevenção de complicações. Autohemotransfusion in preventing postoperative lung complications. *Am J Surg*, 1936; 32:321-3.

Ministério da Saúde, 2015. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Boletim epidemiológico em Secretaria de Vigilância em Saúde, vol. 46.

Molinaro EM. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. 290 p.

Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. Controle da transmissão transfusional. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011; 44 supl 2:64-7.

Moura L. Auto-Hemoterapia, multimídia DVD, 2006.

MSF, 2012. Medicos sin fronteras. <https://www.msf.org.ar/actualidad/chagas-argentina-se-convierte-segundo-pais-del-mundo-producir-principal-medicamento>, acessado em 14/06/2016.

Muhammad N, Murakami T, Inoshima Y, Ishiguro N. Longitudinal study of experimental induction of AA amyloidosis in mice seeded with homologous and heterologous AA fibrils. *Inflamm Res*, 2016; 65:689-99.

Mussano F, Genova T, Munaron L, Petrillo S, Erovigni F, Carossa S. Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets*, 2016; 27:467-71.

Murta SMF, Romanha AJ. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology*, 1998; 116: 165-171.

Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*, 2007; 219:88-102.

Niemi M, Stahle G. The use of ayurvedic medicine in the context of health promotion - a mixed methods case study of an ayurvedic centre in Sweden. *BMC Complement Altern Med*, 2016; 16:62.

Notte BB, Fazzini C, Mooney RA. Reiki's effect on patients with total knee arthroplasty: A pilot study. *Nursing*, 2016; 46:17-23.

O'Leary PA. A method of treating psoriasis. *Can Med Assoc J*, 1943; 48:346.

Olwin JH, Ratajczak HV, House RV. Successful treatment of herpetic infections by autohemotherapy. *J Altern Complement Med*, 1997; 3:155-158.

Ottobelli GA, Sá ARN, Pavanelli MF. Autohemotherapy: hematological and histological changes in wistar rats. *J Health Sci Inst*, 2016; 34:33-7.

Pecoul B, Batista C1, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi ME, Hotez PJ. The BENEFIT trial: where do we go from here? *PLoS Negl Trop Dis*, 2016; 10:e0004343.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, LA Passos. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot*, 2009; 72:441–446.

Polak A, Richle R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*, 1978; 72: 228-32.

Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, del Cacho E, Soy D, Gascon J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54: 4896-9.

Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza AV, Bozza MT. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem*, 2007; 282:24430-6.

Phua KK, Boczkowski D, Dannull J, Pruitt S, Leong KW, Nair SK. Whole blood cells loaded with messenger RNA as an anti-tumor vaccine. *Adv Healthc Mater*, 2014; 3:837-42.

Raeissadat SA, Sedighipour L, Rayegani SM, Bahrami MH, Bayat M, Rahimi R. Effect of platelet-rich plasma (PRP) versus autologous whole blood on pain and function improvement in tennis elbow: a randomized clinical trial. *Pain Res Treat*, 2014; 2014:191525.

Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*, 2012; 26:275-91.

Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*, 2010; 375(9723):1388-402.

Rayegani SM, Raeissadat SA, Taheri MS, Babae M, Bahrami MH, Eliaspour D, Ghorbani E. Does intra articular platelet rich plasma injection improve function, pain and quality of life in patients with osteoarthritis of the knee? A randomized clinical trial. *Orthop Rev (Pavia)*, 2014; 6:5405.

Ren RL, Vora N, Yang F, Longmate J, Wang W, Sun H, Li JR, Weiss L, Staud C, McDougall JA, Chou CK. Variations of dose and electrode spacing for rat breast cancer electrochemical treatment. *Bioelectromagnetics*, 2001; 22:205-11.

Ringler, Douglas J. Inflamação e Reparo. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia Veterinária*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 119-165.

Robbins SS, Cotran RS. *Pathologic basis of diseases*. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2005. p. 1524.

Ross B, Richeson PJ. Intensive autohemotherapy in the treatment of acne: a preliminary report. *U S Nav Med Bull*, 1947; 47:15.

Rossi LA, Molina Rómoli AR, Bertona Altieri BA, Burgos Flor JA, Scordo WE, Elizondo CM. Does platelet-rich plasma decrease time to return to sports in acute muscle tear? A randomized controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016.

Rottem M, Mekori YA. Mast cells and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2005; 4:21-7.

Ruslan, M. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008; 454:428-435.

Samra DJ, Sman AD, Rae K, Linklater J, Refshauge KM, Hiller CE. Effectiveness of a single platelet-rich plasma injection to promote recovery in rugby players with ankle syndesmosis injury. *BMJ Open Sport Exerc Med*, 2015;1:e000033.

Sandrey MA. Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy. *J Athl Train*, 2014; 49(3):428-30.

SanGiovanni TP, Kiebzak GM. Prospective Randomized Evaluation of Intraoperative Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Surgical Site Infection or Delayed Wound Healing. *Foot & Ankle International*, 2016; 37:470-7.

Santin, API; Brito LAB. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira*, 2004; 5(1): 39-45.

Santos EC, Novaes RD, Cupertino MC, Bastos DS, Klein RC, Silva EA, Fietto JL, Talvani A, Bahia MT, Oliveira LL. Concomitant benznidazole and suramin chemotherapy in mice infected with a virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015; 59:5999-6006.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 2010; 10:170-181.

Schurer-Waldheim F. Ueber die Wirkungsweise der Eigenblutbehandlung. *Deutsch. Langenbeck's Archives of Surgery*, 1933; 239:352-362.

Scroggins ML, Litchke LG, Liu T. Effects of multisensory yoga on behavior in a male child with Apert and Asperger syndrome. *Int J Yoga*, 2016; 9:81-4.

Stokley S, Cullen KA, Kennedy A, Bardenheier BH. Adult vaccination coverage levels among users of complementary/alternative medicine - results from the 2002 National Health Interview Survey (NHIS). *BMC Complement Altern Med*, 2008; 8:1-8.

Suresh DH, Suryanarayan S, Sarvajnamurthy S, Puvvadi S. Treatment of a non-healing diabetic foot ulcer with platelet-rich plasma. *J Cutan Aesthet Surg*, 2014; 7:229-31.

SVS, 2017. Secretaria de vigilância em saúde. www.saude.gov.br/svs, acessado em 10/01/2017.

Silva CH, Souza LJ, Papa-Martins M. Avaliação dos efeitos da auto-hemoterapia sobre a cicatrização e presença de leucócitos séricos em ratos wistar. *Revista Eletrônica de Enfermagem do UNIEURO*, 2009; 2:39-57.

Silva DR, SL De Castro, MC Alves, WS Batista, GM Oliveira. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012; 107:211-6.

Soeiro Mde N, de Souza EM, da Silva CF, Batista Dda G, Batista MM, Pavao BP, Araujo JS, Aiub CA, da Silva PB, Lionel J, Britto C, Kim K, Sulikowski G, Hargrove TY, Waterman MR, Lepesheva GI. In vitro and in vivo studies of the antiparasitic activity of sterol 14alpha-demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2013; 57:4151–4163.

Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res*, 2001; 88:877-87.

Teixeira, J. Complicações pulmonares pós-operatórias. *Revista Brasil-Cirúrgico*, 1940; 2:213-230.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005; 288:R345-R353.

Timm BL, da Silva PB, Batista MM, da Silva FHG, da Silva CF, Tidwell RR, Patrick DA, Jones SK, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro MDNC. In vitro and in vivo biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58: 3720 –3726.

Tsuzuki N, Endo Y, Kikkawa L, Korosue K, Kaneko Y, Kitauchi A, Katamoto H, Hidaka Y, Hagio M, Torisu S. Effects of ozonated

autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. *J Vet Med Sci*, 2016; 77:1647-50.

Uemura N, Nakamura K, Ishii Y, Matsukubo S, Nyu S, Nakano S. Electrical stimulation prolongs the survival days of leukemic mice treated with methotrexate. *Jpn J Pharmacol*, 1999; 79:269-274.

Chou CK, McDougall JA, Ahn C, Vora N. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics*, 1997; 18:14-24.

Ulusal, BG. Platelet-rich plasma and hyaluronic acid - an efficient biostimulation method for face rejuvenation. *J Cosmet Dermatol*, 2016.

Veríssimo CJ, Katiki L. Ectima Contagioso em um rebanho ovino e tratamento com auto-hemoterapia ou Iodo. 19ª Reunião Anual do Instituto de Biológico, Anais... São Paulo, 2007. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/suplementos/v68_supl/p025.pdf.

Viotti R, Vigliano C, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, Armenti A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009; 7:157-63.

WHO, 2000. World health organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, World Health Organization, 2000.

WHO, 2010. World health organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases—first WHO report on NTDs. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf?ua=1.

WHO, 2015. World health organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*, 2015; 90:33-44.

WHO, 2016. World health organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, acessado em 10/05/16.

Wu X, Li Z, Liu X, Peng H, Huang Y, Luo G, Peng K. Major ozonated autohemotherapy promotes the recovery of upper limb motor function in patients with acute cerebral infarction. *Neural Regen Res*, 2013; 8: 461–468.

You HS, Cho HH, Kim WJ, Mun JH, Song M, Kim HS, Ko HC, Kim MB, Kim BS. Autologous whole blood injection for the treatment of antihistamine-resistant chronic spontaneous urticaria. *Ann Dermatol*, 2015; 27:784-6.

Zaky S, Kamel SE, Hassan MS, Sallam NA, Shahata MA, Helal SR, Mahmoud H. Preliminary results of ozone therapy as a possible treatment for patients with chronic hepatitis C. *J Altern Complement Med*, 2011; 17:259-63.

8 ANEXOS

ANEXO A - PRÊMIOS E TÍTULOS

Bolsa mestrado nota 10, FAPERJ, 2016.

IV Concurso de Fotografia Sebastião Fontinha - Categoria Biólogos no Ambiente de Trabalho, com a fotografia intitulada "Cannibal", Conselho Regional de Biologia da Segunda Região RJ/ES - CRBio-02, 2016.



IV Concurso de Fotografia Sebastião Fontinha

Certificamos que o juri do IV Concurso de Fotografia Sebastião Fontinha atribui a *Beatriz Philot Pavão* o 1º lugar na Categoria "Biólogos no Ambiente de Trabalho", com a foto "Cannibal", durante o XXII ENBio: Os Grandes Desafios da Humanidade, realizado nos dias 22 e 23 de novembro de 2016, na sede do Sistema FIRJAN.

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2016


Dr. Fernando Luiz Di Giorgio
Presidente
CRBio 015087/02-D





Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines against *Trypanosoma cruzi*

M. R. Simões-Silva,^a A. S. G. Nefertiti,^a J. S. De Araújo,^a M. M. Batista,^a P. B. Da Silva,^a M. T. Bahia,^b R. S. Menna-Barreto,^a B. P. Pavão,^a J. Green,^c A. A. Farahat,^{c,d} A. Kumar,^c D. W. Boykin,^c M. N. C. Soeiro^a

Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil^a; Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Medicina & Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil^b; Department of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA^c; Department of Pharmaceutical Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, Mansoura, Egypt^d

The current treatment of Chagas disease (CD), based on nifurtimox and benznidazole (Bz), is unsatisfactory. In this context, we performed the phenotypic *in vitro* screening of novel mono- and diamidines and drug interaction assays with selected compounds. Ten novel amidines were tested for their activities against bloodstream trypomastigote (BT) and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Y and Tulahuen strains) and their toxicities for mammalian host cells (L929 cells and cardiac cells). Seven of 10 molecules were more active than Bz against BT, with the most active compound being the diamidine DB2267 (50% effective concentration [EC₅₀] = 0.23 μ M; selectivity index = 417), which was 28-fold more active and about 3 times more selective than the standard drug. Five of the six monoamidines were also more active than Bz. The combination of DB2267 and DB2236 in fixed-ratio proportions showed an additive effect (sum of fractional inhibitory concentrations < 4) on BT. Interestingly, when intracellular forms were exposed to DB2267, its activity was dependent on the parasite strain, being effective (EC₅₀ = 0.87 \pm 0.05 μ M) against a discrete typing unit (DTU) II strain (strain Y) but not against a representative DTU VI strain (strain Tulahuen) even when different vehicles (β -cyclodextrin and dimethyl sulfoxide) were used. The intrinsic fluorescence of several diamidines allowed their uptake to be studied. Testing of the uptake of DB2236 (inactive) and DB2267 (active) by amastigotes of the Y strain showed that the two compounds were localized intracellularly in different compartments: DB2236 in the cytoplasm and DB2267 in the nucleus. Our present data encourage further studies regarding the activities of amidines and provide information which will help with the identification of novel agents for the treatment of CD.

Chagas disease (CD) is a neglected disorder endemic in 21 countries of Latin America. According to the World Health Organization, 8 million people are infected worldwide and approximately 10 million others are at risk of infection, with 14,000 new cases and 12,000 deaths occurring each year (1). This pathology was discovered by the Brazilian researcher Carlos Chagas (2) and has as the etiological agent the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. There are several transmission routes, including vector transmission by triatomine bugs from the Reduviidae family, blood transfusion or organ transplantation, congenital transmission, and oral contamination (3, 4). The disease is characterized by two distinct phases, the acute and chronic phases. During the acute phase, patients can be asymptomatic or mildly symptomatic, which likely impairs an early and differential diagnosis. After parasitemia is controlled, a chronic phase is established and is represented by sub-patent parasitemia and positive serology. Approximately 60 to 70% of the patients in this phase present with an indeterminate form, while 30 to 40% develop a cardiac and/or digestive form of the disease years or even decades after the infection (5).

CD therapy is based on two medicines: nifurtimox and benznidazole (Bz). Both require long-term treatment and produce severe adverse effects, while they yield only low cure rates in the late chronic phase (6–8). New studies are essential for the identification of more selective and efficient chemotherapeutic agents with reduced toxic effects, which often result in the avoidance or abandonment of therapy by patients. In this context, it is essential that hit compounds show potent activity and be efficacious against strains representative of the different *T. cruzi* discrete typing units (DTUs) relevant for human infection to provide new drugs usable in the different areas where CD is endemic (9).

Drug discovery programs are increasingly employing combination strategies, in large part due to the seemingly constant problem of drug resistance but also due to the potential for the discovery of synergism. Use of this approach has recently been successful for the discovery of drugs with activity against several parasitic diseases, including leishmaniasis, malaria, and CD (10–12). It seems important to routinely include this strategy in efforts to discover drugs for the treatment of CD.

Aromatic diamidines, such as pentamidine, are in clinical use for different pathologies, such as leishmaniasis, systemic fungal infection, and stage 1 human African trypanosomiasis, as well as for several veterinary purposes (13). Recently, a new class of diamidines, arylimidamides, has been found to be effective against several pathogens, including *T. cruzi*. The excellent trypanocidal activity of this new class of amidines *in vitro* and *in vivo* encourages further exploration of the amidine family of compounds (14–16).

Thus, the goal of this work is the screening of new heterocyclic amidines with the aim of identifying new compounds with efficacy

Received 23 July 2015 Returned for modification 24 March 2016

Accepted 16 May 2016

Accepted manuscript posted online 23 May 2016

Citation Simões-Silva MR, Nefertiti ASG, De Araújo JS, Batista MM, Da Silva PB, Bahia MT, Menna-Barreto RS, Pavão BP, Green J, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MNC. 2016. Phenotypic screening *in vitro* of novel aromatic amidines against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4701–4707. doi:10.1128/AAC.01788-15.

Address correspondence to M. N. C. Soeiro, soeiro@ioc.fiocruz.br.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



Antitrypanosomal Activity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Inhibitors VNI and VFV in the Swiss Mouse Models of Chagas Disease Induced by the *Trypanosoma cruzi* Y Strain

F. H. Guedes-da-Silva,^a D. G. J. Batista,^a C. F. Da Silva,^a J. S. De Araújo,^a
B. P. Pavão,^a M. R. Simões-Silva,^a M. M. Batista,^a K. C. Demarque,^a O. C. Moreira,^b
C. Britto,^b G. I. Lepesheva,^c M. N. C. Soeiro^a

Laboratório de Biologia Celular^a and Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas,^b Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Department of Biochemistry, School of Medicine, Institute for Global Health, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA^c

ABSTRACT Chagas disease is a life-threatening infection caused by a variety of genetically diverse strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. The current treatment (benznidazole and nifurtimox) is unsatisfactory, and potential alternatives include inhibitors of sterol 14 α -demethylase (CYP51), the cytochrome P450 enzyme essential for the biosynthesis of sterols in eukaryotes and the major target of clinical and agricultural antifungals. Here we performed a comparative investigation of two protozoan-specific CYP51 inhibitors, VNI and its CYP51 structure-based derivative VFV, in the murine models of infection caused by the Y strain of *T. cruzi*. The effects of different treatment regimens and drug delivery vehicles were evaluated in animals of both genders, with benznidazole serving as the reference drug. Regardless of the treatment scheme or delivery vehicle, VFV was more potent in both genders, causing a >99.7% peak parasitemia reduction, while the VNI values varied from 91 to 100%. Treatments with VNI and VFV resulted in 100% animal survival and 0% natural relapse after the end of therapy, though, except for the 120-day treatment schemes with VFV, relapses after three cycles of immunosuppression were observed in each animal group, and quantitative PCR analysis revealed a very light parasite load in the blood samples (sometimes below or near the detection limit, which was 1.5 parasite equivalents/ml). Our studies support further investigations of this class of compounds, including their testing against other *T. cruzi* strains and in combination with other drugs.

KEYWORDS Chagas disease, chemotherapy, sterol 14 α -demethylase, inhibitors, VNI, VFV, *Trypanosoma cruzi*

Chagas disease (CD), or American trypanosomiasis, is a zoonosis caused by multiple strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which are transmitted to more than 150 mammalian species by the triatomine insect vector (kissing bugs). *T. cruzi* has been infecting humans in South America for at least 9,000 years (1) and was discovered 107 years ago by Carlos Chagas (2). Although, according to the WHO, the number of infected patients has dropped significantly within the past decades, most likely because of successful vector control programs (3), CD still represents an important public health issue, remaining endemic in 21 Latin American countries (more than 6 million patients, with the largest estimated numbers in Argentina, Brazil, and Mexico [4]) and spreading outside the area where CD is endemic as a result of human migration (5–7). The broadening of the area of the insect vector habitat is particularly alarming in the United States (8), where kissing bug bites were reported in 43 states; studies in Louisiana

Received 29 September 2016 Returned for modification 21 November 2016 Accepted 22 January 2017

Accepted manuscript posted online 6 February 2017

Citation Guedes-da-Silva FH, Batista DGJ, Da Silva CF, De Araújo JS, Pavão BP, Simões-Silva MR, Batista MM, Demarque KC, Moreira OC, Britto C, Lepesheva GI, Soeiro MNC. 2017. Antitrypanosomal activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the Swiss mouse models of Chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02098-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02098-16>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to M. N. C. Soeiro, soeiro@ioc.fiocruz.br.