

São Paulo, 24 de Novembro 2020

Ilustríssima
Comissão de Pós-Graduação
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde
IPEN

Nome da Candidata: Lizz Nataly Villarroel Fernández
e-mail: lvillarroel7000@gmail.com – Telefone: (+591) 72732101
Nome do orientador: Emerson Soares Bernardes
e-mail: ebarnardes@ipen.br – Telefone: (11) 98280-0489

Área de concentração: Medicina Nuclear e Radiofarmácia

Linha de pesquisa: Radiofármacos para aplicação em diagnóstico e terapia em Medicina Nuclear

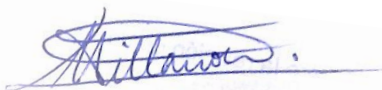
Curso: Mestrado Profissional

Prezados Senhores,

Venho por meio deste, mui respeitosamente, apresentar o Plano de Trabalho intitulado "**AVALIAÇÃO DO RADIOFÁRMACOS [18F] FDG E [18F] FMISO PARA DETECÇÃO DE CHAGAS POR PET / CT**", para análise e parecer desta Comissão de Pós-Graduação.

Declaro estar ciente que, caso a pesquisa deste Plano de Trabalho envolva “seres humanos, animais de laboratório ou silvestres, de forma direta ou indireta, em sua totalidade ou partes deles, incluindo o manejo de informações e materiais” será necessária solicitação de parecer do **Comitê de Ética na Pesquisa**, e/ou que, caso a pesquisa deste Plano de Trabalho envolva “trabalhos de engenharia genética, construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação ou descarte de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e derivados” será necessária solicitação de parecer do **Comitê de Biossegurança**.

Atenciosamente,



Assinatura da Aluna



Assinatura do Orientador

PLANO DE TRABALHO PARA MESTRADO PROFISSIONAL

Candidata: Lizz Nataly Villarroel Fernández

Orientador: Emerson Soares Bernardes

Título do trabalho: "AVALIAÇÃO DO RADIOFÁRMACOS [18F] FDG E [18F] FMISO PARA DETECÇÃO DE CHAGAS POR PET / CT",

Resumo:

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é uma técnica de medicina nuclear que usa substâncias radioativas emissoras de pósitrons incorporadas a sistemas fisiológicos *in vivo* para obter imagens da distribuição espaço-temporal de processos moleculares ou celulares. As imagens tomográficas representam a distribuição volumétrica do radiofármaco e podem ser utilizadas para acúmulo e / ou eliminação do mesmo em órgãos ou tecidos específicos que fornecem informações sobre o organismo.

Os sistemas de tomografia por emissão de pósitrons para estudar pequenos animais (microPET) representa um desafio devido ao tamanho e peso dos sujeitos a serem estudados. Para obter dados funcionais úteis, os sistemas microPET devem ter alta sensibilidade (para minimizar a dose e reduzir o tempo de estudo), ao mesmo tempo, produzir imagens com alta resolução espacial.

A combinação de técnicas de medicina nuclear com outras técnicas de monitoramento de doenças e tratamentos em modelos animais pode contribuir para a obtenção e validação de resultados, como imunologia, genética e parasitologia. Razão pela qual se pretende desenvolver este trabalho de pesquisa, levando-se em consideração que a doença de Chagas é endêmica, na região da América Latina, e que existem poucos estudos sobre a detecção de Chagas por PET / CT.

A doença de Chagas afeta cerca de 12 milhões de pessoas (APT. W, 2010) que sofrem desta doença. Considerando que cerca de 30% dos pacientes com Chagas sofrem de doenças importantes, sejam elas fisiológicas e morfológicas. Da mesma forma, é possível encontrar reativações do parasita *Trypanosoma cruzi* em indivíduos afetados por Chagas, como consequência de imunossupressão secundária a infecções, neoplasias, uso de imunossupressores ou quimioterapia (MINSAL, Chile 2010 Guia Clínico "Guias para Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Doença de Chagas ".) favorecendo o desenvolvimento de formas graves da doença. O presente estudo tem como objetivo analisar a doença de Chagas por meio de modelos murinos, e imagens de PET / CT, que possam contribuir de forma otimizada para estudos clínicos no acompanhamento do paciente durante o curso da doença, para evitar complicações e alterações fisiológicas graves como: cardiomegalia, megacólon, megaesôfago, principalmente.

Atualmente, sabe-se que o *Trypanosoma cruzi* possui vários tipos de linhagens associadas à clínica e pathogenêse da doença e até mesmo com o grau de resistência aos medicamentos utilizados. Embora todas as linhagens produzam a doença de Chagas. Uma das cepas aplicadas em modelos de estudo experimental é a cepa de γ da linhagem II que será utilizada no presente estudo para a infecção de modelos experimentais.

Da mesma forma, foi considerada para a presente pesquisa, a capacidade do *Trypanosoma cruzi* em função da adaptação de seu microambiente, produção de vesículas extracelulares, que intervêm na prevenção da resposta imune e fatores relacionados às espécies reativas como o oxigênio, nitrogênio ROS, NOS, associado à hipóxia.

Portanto, a través deste projeto pretende-se: A detecção por imagem da doença de Chagas por meio da síntese de moléculas associadas ao ^{18}F -FDG e ^{18}F -FMISO, utilizando métodos de pesquisa pre-clínica e imagens PET/CT de alta resolução.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, descoberta em 1909 por Carlos Chagas em Minas Gerais (Brasil). É endêmica em grande parte do território americano (Ministério da Saúde, Manual Operacional) e afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas (APT. W, 2010). (Técnico da OMS) (Report Series 905. 2002) Sendo um verdadeiro problema de saúde e um desafio médico-sanitário, pela alta prevalência e alta morbimortalidade que produz nas populações rurais, marginais e de baixa renda (Ministério da Saúde Bolívia 2007 Manual Operacional).

Em relação ao tratamento, observa-se que, 111 anos após a descoberta da doença de Chagas (Ministério da Saúde Bolívia 2007 Manual Operacional), ainda não existe um grande grupo de medicamentos e estratégias para prevenir e controlar a tripanossomíase americana. A comunidade científica está desenvolvendo pesquisas com novas moléculas como: mostardas nitrobenzil fosforamida (Buchanan-Kilbey G 2013), 5,7-diaril-2,3-dihidro-1,4-diazepinas (diarildiazepinas), moléculas sintetizadas por ciclocondensação de flavonas substituídas por etilenodiamina (Menezes JC 2015) 5,7-diaril-2,3-dihidro-1,4-diazepinas (diarildiazepinas), moléculas sintetizadas por ciclocondensação de flavonas substituídas por etilenodiamina (Díaz CA 2012), azóis como posaconazol, ravuconazol (Keenan M 2014), bem como fexinidazol (Good Clinical Practice 2020). Que mostraram uma certa capacidade, tripanocida, incluindo moléculas derivadas de compostos naturais, como *Ampelozizyphus amazonicus* (Santos KK. 2012),

A doença de Chagas é uma condição complexa, de difícil erradicação e cujo tratamento não é totalmente eficaz, particularmente na fase crônica da doença (Manual Operativo do Ministério da Saúde) (APT, W.; Zulantay, 2011).

Por meio de diversos estudos sobre Chagas, foi demonstrada, níveis muito elevados de diversidade genética, de *Trypanozoma cruzi*, e um grande número de marcadores genéticos tem sido usado para estratificar a espécie em várias subdivisões. Muitas evidências apoiam a existência de uma estrutura multiclonal das populações de *T. cruzi* (Tibayrenc et al., 1991); (Tibayrenc e Ayala, 2002); (Sturm e Campbell, 2010). A elevada diversidade genética, e os isolados apresentam características biológicas distintas, provavelmente relacionadas com as diferentes apresentações clínicas da doença de Chagas (forma indeterminada, manifestações cardíacas e digestivas). (Breniere SF, Bosseno MF 1995)

Essas diferenças são expressas nos níveis de parasitemia e tropismo por determinados órgãos, bem como no desenvolvimento de várias patologias em mamíferos infectados, incluindo o ser humano. (García, 2011).

A doença de Chagas passa por muitas variáveis de estudo, que são muito específicas dela, e tornam suas pesquisas muito interessantes. Por exemplo, tem duas fases: a fase aguda e a fase crônica (CDC Fact Sheet 2017).

As duas fases podem ser assintomático ou ser potencialmente mortais. (MINSAL, Chile 2010 Guia Clínico "Guias para o Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Doença de Chagas")

Fase aguda.- Esta fase ocorre nas primeiras semanas entre 7 e 84 dias. (Isaza S, 2012) Geralmente passa despercebido porque não apresenta sintomas ou exibe apenas sinais e sintomas leves que não são exclusivos da doença de Chagas (CDC Hoja informative 2017)

Fase crônica.- Durante esta fase a infecção pode permanecer assintomática por décadas ou mesmo por toda a vida. No entanto, alguns pacientes apresentam complicações ao longo da vida, como:

- Complicações cardíacas, que pode incluir o coração aumentado (cardiomiopatia), insuficiência cardíaca, ritmo ou frequência cardíaca anormal e parada cardíaca (morte súbita) (CDC Hoja informative 2017); ou
- Complicações intestinais, que podem incluir um aumento do esôfago (megaesôfago) ou cólon (megacólon) e pode causar dificuldades para comer ou defecar (CDC Hoja informative 2017).

Da mesma forma, outra variável que se destaca na doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, são os estágios morfológicos, que o parasita adota (chamados de amastigota, epimastigota e tripomastigota). Que estão relacionadas ao tipo de hospedeiro em que se encontra e à fase da doença, entre os principais aspectos. (Apt W. 2008) (Tyler KM. 2001)

Da mesma forma, pesquisas têm sido desenvolvidas a respeito de moléculas (fragmentos de membrana e componentes citosólicos, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucléicos) chamadas vesículas extracelulares VEs que podem afetar o curso da infecção e a progressão da doença causada pelo parasite, através da modulação das respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro (M. F. Goncalves et al 1991; Trocoli Torrecilhas A. C. 2009; Bayer-Santos E. et al, 2013; Cestari I. et al 2012), participando ativamente dos processos de adesão e invasão celular.

Da mesma forma, quando o *T. cruzi* entra no hospedeiro, a primeira linha de defesa é ativada, ou seja, a resposta imune inata (Almeida I.C. et al 2000), por meio da sinalização do receptor Toll (TLR) e ativação de macrófagos por glicoproteínas semelhantes à mucina (Almeida I. C. et al 2001, Ferguson M. A. J. et al 1999; resultando no aumento da produção de IL-12, IFN- γ e óxido nítrico (NO) (Campos M. A. S. et al 2001).

Porém, o *Trypanosoma cruzi* responde à variação das mudanças por possuir plasticidade morfogenética para se adaptar a um microambiente específico, mimetizando propriedades biológicas e antigênicas, como pôde ser observado no estudo de Graterol D. 2013 através do cultivo do *Trypanosoma cruzi* com diferentes tensões de oxigênio (Graterol, et al 2013)

O exposto parece indicar que o *Trypanosoma cruzi* é altamente afetado pelas condições que o cercam durante as fases de infecção, razão pela qual esta pesquisa, pretende aplicar o ^{18}F -FMISO devido às suas propriedades como rádio-traçador na imagem PET, que permite uma avaliação não invasiva da hipóxia.

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade de detecção do *Trypanosoma cruzi* por meio de PET / CT utilizando radiofármacos convencionais como ^{18}F -FDG e ^{18}F -FMISO, em modelos murinos, infectados com a linhagem II cepa γ em suas fases aguda e crônica da doença.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL.

Realizar os estudos de pesquisa pré-clínica utilizando o equipamento microPET/SPECT/CT para a avaliação do radiofármacos ^{18}F -FDG e ^{18}F -FMISO na detecção da doença de Chagas por PET / CT.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Avaliar a influência dos estágios de hipóxia tecidual com respeito aos casos de infecção aguda e crônica de infecção através de imagem PET/CT utilizando o radiofármaco ^{18}F -FMISO.
2. Avaliar a sensibilidade e especificidade da imagem PET/CT utilizando o ^{18}F -FDG na detecção de alterações morfológicas e fisiológicas dos órgãos típicos da doença de Chagas, nas fases aguda e crônica de infecção.

3 JUSTIFICATIVA

3.1 Impacto

Contribuir por meio de estudos científicos para o desenvolvimento de protocolos utilizados na detecção de Chagas, monitorados por PET / CT.

3.2 Aplicabilidade

O trabalho de investigação desenvolvido será divulgado na comunidade científica da área de medicina nuclear de forma gratuita e imparcial.

3.3 Inovação

A Organização Pan-Americana da Saúde considera a doença de Chagas uma doença tropical negligenciada ou doença da pobreza que, apesar de ser endêmica em 21 países das Américas, não foram adotadas novas e melhores estratégias para combatê-la (Informações gerais da OPS: Doença de Chagas 2020).

Portanto, o presente trabalho de pesquisa permitirá um maior conhecimento sobre esta doença, por meio do uso da tecnologia nuclear aplicada à medicina, visto que atualmente são poucos os estudos relacionados ao PET / CT associado a Chagas.

Da mesma forma, o estudo pode proporcionar maior conhecimento científico a respeito dos fatores de *Trypanosoma cruzi*, relacionadas às espécies reativas de oxigênio, ROS e NOS, associados a hipóxia, assim como outros aspectos relacionados à evasão da resposta imune.

3.4 Complexidade

A complexidade da pesquisa está baseada na análise das variáveis propostas no tema de pesquisa:

A. COMPLEXIDADE DO PONTO DE VISTA DA DETECÇÃO:

Até o momento, não existe um protocolo oficial, descrito e aplicável para o diagnóstico da doença de Chagas, utilizando a tecnologia PET / CT.

No entanto, alguns estudos com ^{18}F -FDG, como o realizado por Moll-Bernardes RJ 2020 janeiro e junho 2020, apontam a possibilidade de futuras aplicações do uso de PET / CT na prevenção de complicações patológicas causadas pela doença de Chagas, como arritmias ventriculares.

Da mesma forma em relação ao ^{18}F -FMISO, este compartilha quimicamente muitas características semelhantes a outros derivados do nitroimidazol, utilizados na terapia farmacológica de Chagas (Benzinidazol, Ravuconazol, Posaconazol, Fexinidazol; Bahia MT 2012).

Apesar dos estudos em geral sobre Chagas e suas características hipóxicas serem muito limitados, alguns dados experimentais e clínicos para Chagas, como os de Simoes M 2002: Sustentam eventos isquêmicos transitórios associados a distúrbios funcionais do fluxo sanguíneo coronariano, como parte relevante do mecanismo, principalmente na cardiomiopatia chagásica crônica.

O trabalho realizado por Simones 2002 indica que a miocitólise é uma forma particular de degeneração celular aparentemente relacionada à hipóxia secundária a episódios isquêmicos repetitivos de baixa intensidade. Além disso, foram mostradas áreas com vascularização diminuída, o que tem sido denominado decapilarização reativa mesenquimal.

B. COMPLEXIDADE DO PONTO DE VISTA INFECTIVO:

Por meio de diferentes estudos de pesquisa foi identificado que a espécie *T. cruzi* mostra níveis muito altos de diversidade genética e um grande número de marcadores genéticos usado para estratificar as espécies em várias subdivisões. Por tanto, propõe-se utilizar para este trabalho a cepa γ da linhagem II, para aplicar aos modelos experimentais (camundongos). Levando em consideração as diversas variáveis para o acompanhamento de Chagas, entre elas o desenvolvimento da patologia aguda e a transição para a crônica.

4. MATERIAISE MÉTODOS

PROPOSTA:

- A cepa γ do linhagem II, será usada como cepa de referência, na infecção dos modelos experimentais com chagas.
- Serão utilizados dois radiofármacos ^{18}F -FDG e ^{18}F -FMISO para a realização das imagens com PET/ CT.
- A linhagem de camundongo BALB / c será usada como modelo experimental para o estudo.

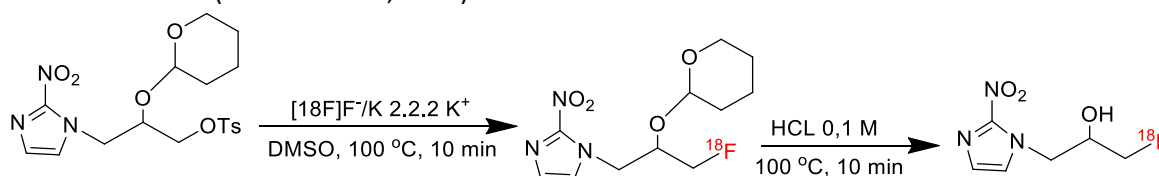
Para o desenvolvimento deste trabalho, serão levadas considerações, relacionadas ao processo de investigação. Principalmente:

1. Produção dos radiofármacos ^{18}F -FDG e ^{18}F -FMISO,
2. Cultura do parasita,
3. Infecção em modelos experimentais,
4. Biodistribuição e imagen,
5. Farmacocinética
6. Histopatologia

1. PRODUÇÃO DOS RADIOFÁRMACOS ^{18}F -FMISO E ^{18}F -FDG

1.1. Radiossíntese do ^{18}F -FMISO

O [^{18}F]FMISO (esquema 1) será preparado seguindo os processos de marcações não automatizadas dos radiofármacos (SORGER *et al.*, 2003).



Esquema 1 – Radiossíntese do ^{18}F -FMISO.

Brevemente, uma amostra de 1,5 mL do íon ^{18}F -Fluoreto [^{18}F]⁻ (proveniente do Cíclotron), foi passada através de uma coluna de troca iônica (SEP-PAK light, QMA). Em média, uma atividade de 2,96 GBq do [^{18}F]⁻ ficou adsorvido no pequeno cartucho QMA. Em seguida, o [^{18}F]⁻ foi eluído do cartucho QMA lentamente com uma mistura de Kryptofix 2.2.2 (11,0 mg; 29,2 μmol) em 800 μL de acetonitrila e K_2CO_3 , (2,2 mg; 15,9 μmol) em 200 μL de água Milli Q. Após este passo, a solução de [^{18}F]-F/ K 2.2.2 K^+ foi seca sob uma corrente de gás de N_2 a 100°C. Para garantir a eliminação de água residual, a solução foi submetida a três ciclos de destilação azeotrópica com acetonitrila (1mL) a 100 °C.

Para o [^{18}F]FMISO, uma solução de 4 mg (9,4 μmol) de precursor 1-(2-nitro-10-imidazolil)-2-O-tetrahidropirani-3-O-toluenosulfonilpropano-diol (NITTP) em 1 mL de acetonitrila anidro foi adicionado ao resíduo da evaporação, e a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 min, seguida por hidrólise com 1 M HCl (1 mL) a 100 °C por 3 min.

Após resfriamento até à temperatura ambiente, foi adicionado NaOH 1 M (1 mL) para neutralizar. A mistura de reação bruta foi passada por um cartucho de fase reversa Sep-Pak C18 Plus para purificação; o [¹⁸F]FMISO foi retido no cartucho e eluído com 1 mL de etanol. O produto puro de [¹⁸F]FMISO será diluído com salina/ etanol a 10% e depois esterilizados com membrana estéril de 0,22 µm.

1.2. Radiossíntese do ¹⁸F-FDG

Para a síntese de ¹⁸F-FDG, uma solução de 10 mg (0,02 mmol) de triflato de manose em 0,8 ml de acetonitrila será adicionada ao resíduo seco contendo o complexo [K / K₂.2.2] + ¹⁸F. A reação será realizada em um recipiente fechado a 80 °C por 5 min. A mistura será evaporada até um volume de 0,13-0,2 mL passando nitrogênio por 2 min e então resfriada a 40-45 °C. Ao vaso reaccional será adicionado 0,9 mL de NaOH 0,3 M. A mistura será agitada por 10 s em Vortex e hidrolisada por 100 s em uma corrente de nitrogênio. Em seguida, a mistura será neutralizada com 0,8 mL de HCl 0,5 M. A temperatura será elevada para 120 °C, e vestígios de acetonitrila serão removidos passando nitrogênio por 4 min. A mistura de reação será diluída com 3 mL de água e passada através de uma coluna cheia com 0,5 g de resina de troca catiônica LC-SCX e 0,5 g de LC Alumina N de alumina neutra. Na saída da coluna, será colocado um filtro esterilizante e um frasco para o produto.

1.3. Controle de qualidade do [¹⁸F]FMISO e ¹⁸F-FDG

O produto ¹⁸F-FMISO será submetido a análise por CLAE para determinar a pureza radioquímica em coluna analítica:

- Fase estacionária: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 µ, 100 Å.
- Fase móvel: Solvente (A) Água Milli Q + 0,1%TFA, Solvente (B) 100% Acetonitrila
- Corrida: de 10% a 100% de Acetonitrila em 20 min.
- Fluxo: 1 mL/min.
- Comprimento de onda: 300 nm.

O produto será monitorado por detector UV e de radioatividade, e o padrão não radioativo será utilizado como referência no processo cromatográfico.

O controle de qualidade do ¹⁸F-FDG será realizado por TLC (cromatografia em camada fina) utilizando a fase estacionária TLC-SG (10 cm) e a fase móvel: acetonitrila : água (95% : 5%, v/v). o R_f esperado para o ¹⁸F-FDG é de 0,45, para o ¹⁸F é de 0 e para o ¹⁸F-FDG acetilado é de 0,8-0,9.

2. CULTIVO DEL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi*:

De acordo com o artigo de Velazco C. *et al* 1997, que descreve o protocolo de Nogueira *et al* 1975. Os parasitas devem ser cultivados a 28 ° C, por 8 dias em meio LIT (Liver and Tryptone Infusion), (Difco), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado, após o que 40% de soro humano fresco será adicionado às culturas por 2h a 37 ° C e 5% de CO₂, a fim de eliminar o população de epimastigotas presente (Nogueira et al. 1975). Posteriormente, as culturas serão submetidas à centrifugação a 2500 rpm, 4 ° C, por 20 min. e incubado por mais duas horas nas mesmas condições, para permitir que os tripomastigotas metacíclicos (infectantes) subam para o sobrenadante. Finalmente, os referidos tripomastigotas serão recuperados do sobrenadante por centrifugação a 3500 rpm, 4 ° C, durante 20 min. e contados na câmara de Neubauer ”.

CÉLULAS MAMÍFERAS

“Seguindo o estudo de Velazco C. et al 1997, foram usados fibroblastos de rim de macaco verde africano, pertencentes à linha celular Vero ATCC. As referidas células devem ser mantidas em meio MEM (Gibco:MEM) rico em glicose, suplementado com SFB inativado a 10% (MEM completo) e uma

solução de penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100 mg/ml), a 37 °C e 5% de CO₂, até a obtenção do monocamada com 60-70% de confluência. Para o repique e obtenção de novas monocamadas 7 ml de uma solução de tripsina a 1% em solução de Hanks (Gibco-BRL) foram adicionados às monocapas já formadas, permitindo atuar por 10 min. Após este tempo, 7 ml de MEM completo foram adicionados. As células foram colhidas e centrifugadas por 5 min a 1500 rpm, 4 ° C. Por fim, as células foram contadas e ajustadas para a concentração de 1×10^6 1 ml. Sendo semeado em caixas de cultura de 25 cm²”.

INFECÇÃO DE CÉLULAS VERO.-

“O artigo de Velazco C. et al 1997 detalha o seguinte: Os tripomastigotas metacíclicos ressuspensos em meio MEM incompleto (sem FBS), foram adicionados às monocamadas de células Vero na proporção de 3 parasitas 1 célula, permitindo-lhes interagir por 24 h. Após este tempo, a monocamada foi lavada com MEM incompleto e reconstituída com MEM completo e incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por seis dias. Por fim, as culturas foram examinadas diariamente em microscópio invertido para avaliar o aparecimento de tripomastigotas no meio de cultura”.

OBTENDO TRIPOMASTIGOTES EXTRACELULARES DERIVADOS DA CULTURA DE TECIDOS

A esse respeito, Velazco C. et al 1997 menciona: “Após 7 dias de infecção, tempo em que os tripomastigotas apareceram no sobrenadante da monocamada, este foi removido e a monocamada lavada com MEM incompleto. O sobrenadante obtido foi primeiramente centrifugado a 2500 rpm e 4 ° C, por 5 min, a fim de remover os restos celulares, de modo que o precipitado foi descartado e o sobrenadante (rico em amastigotas e tripomastigotas) foi recentrifugado.) a 3000 rpm, 4 ° C por 20 min e incubado a 37 ° C e 5% de CO₂ por 2 h, para que os tripomastigotas aumentem o sobrenadante. Tempo após o qual, o sobrenadante foi centrifugado a 3500 rpm, 4 ° C, por 20 min., A fim de recuperar os tripomastigotas no "pellet", que foi ressuspensão em 1 ml de MEM incompleto. Os parasitas assim obtidos foram finalmente contados e usados para infectar uma única camada de células Vero (de acordo com a terceira etapa). Na monocamada inicial, se o meio MEM completo for adicionado e incubado novamente, surge no sobrenadante o aparecimento de novos tripomastigotas (segunda e terceira coleções) ”.

3. INFECÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS .

Parasitas, em fase logarítmica e forma infectante adequada, serão coletados e dispostos para infecção em modelos experimentais, levando-se em consideração da mesma forma os protocolos aplicados no IPEN.

Por este aspecto relacionado à Infecção em modelos experimentais; As experiências de laboratório, realizadas nos seguintes artigos, são apresentadas a seguir:

- Rodriguez A. M. (2000), BLOOD AND CULTURE TRYPOMASTIGOTES FORMS OF Trypanosoma cruzi Y: I.- DIFFERENCE ON THE INFECTIVITY IN BALB/C MICE.
- Aragort De Rossell (2000).BLOOD AND CULTURE TRYPOMASTIGOTES FORMS OF Trypanosomacruzi Y.: II PATHOLOGY OF CHAGAS' DISEASE IN BALB/C MICE.

Animais:

Camundongos machos e fêmeas homozigotos *BALB / c*

Parasitas:

Tripomastigotas de cultura celular (Tr.cc.) da mesma cepa, mantida por infecção de células Vero cultivadas em Meio MEM / 10% de soro bovino, colhendo os parasitas liberados em 72 horas.

A suspensão do parasita assim obtida será centrifugada e ressuspensa em PBS até à obtenção das doses de 100 formas tripomastigotas.

Infecções:

Camundongos BALB/c machos e fêmeas de 7 a 8 semanas de idade serão inoculados intraperitonealmente com 100 formas tripomastigotas.

A parasitemia será avaliada duas vezes por semana, a partir do 4º dia da inoculação, por meio da contagem dos parasitas no sangue extraído da cauda do camundongo. A média dos maiores valores de parasitemia alcançados entre animais da mesma idade e sexo inoculados com a mesma dose de parasitas, está relacionada à média dos valores dos níveis máximos de parasitemia.

A mortalidade será registrada diariamente e as suas medidas serão expressas em porcentagem da mortalidade e no período da mortalidade.

4. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO, IMAGEM PET/CT E FARMACOCINÉTICA.

Para os estudos de biodistribuição e imagem, os animais na fase aguda ou na fase crônica de infecção com T cruzi serão divididos em 2 grupos (5 animais por grupo).

Os animais serão pesados, contidos manualmente e, cada animal de cada grupo será anestesiado com isoflurano por inalação (concentração inicial 0.5%- anestesia geral 1 a 1.87%) e colocados na câmara de escaneamento microPET (microPET focus 220 siemens). Cada animal receberá por via endovenosa caudal:

Grupo 1: Animais com infecção aguda por T cruzi - será injetado na veia da cauda com 5 MBq de ¹⁸F-FMISO (diluído em solução salina).

Grupo 2: Animais com infecção aguda por T cruzi - será injetado na veia da cauda com 5 MBq de ¹⁸F-FDG (diluído em solução salina).

Grupo 3: Animais com infecção crônica por T cruzi - será injetado na veia da cauda com 5 MBq de ¹⁸F-FMISO (diluído em solução salina).

Grupo 4: Animais com infecção crônica por T cruzi - será injetado na veia da cauda com 5 MBq de ¹⁸F-FDG (diluído em solução salina).

Grupo 5: Animais saudáveis - será injetado na veia da cauda com 5 MBq de ¹⁸F-FMISO (diluído em solução salina).

Grupo 6: Animais saudáveis - será injetado na veia da cauda com 5 MBq de ¹⁸F-FDG (diluído em solução salina).

A aquisição da imagem PET dinâmica será realizada durante 60 minutos e durante esse período, a câmara de escaneamento será mantida a 35°C. Para os estudos com ¹⁸F-FDG, os animais serão mantidos em jejum por um período de 12 horas antes da aquisição da imagem por PET.

Após o estudo de imagem dinâmica os mesmos animais serão sacrificados, e os principais órgãos serão removidos e a atividade e peso (g) em cada órgão será medida num contador gama.

A radioatividade de cada órgão de interesse será medida em um contador-γ e a %ID/g será calculada. Os resultados serão expressos como % de dose injetada (%DI) nos diferentes órgãos, calculados conforme a seguinte equação 1:

$$\%DI_{\text{órgão}} = \frac{A(\text{órgão})}{DI_{\text{total}} - A(\text{perdas})} \times 100 \quad (1)$$

Onde DI_{total} é a atividade no momento da medição do órgão e A é atividade. Os resultados serão expressos como (média ± desvio padrão). A radioatividade das amostras de tecido será calibrado utilizando uma alíquota do radiofármaco de concentração conhecida.

A visualização das imagens, processamento e análise serão realizados com o software PMOD (PMOD Technologies, Zurich).

Para os estudos de farmacocinética, os mesmos grupos de estudo serão utilizados e brevemente, após a injeção dos radiofármacos ¹⁸F-FMISO ou ¹⁸F-FDG, alíquotas de 5 µL de sangue serão retiradas da veia dos camundongos aos 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min pós injeção intravenosa. A radioatividade em cada

amostra de sangue será medida num contador gama. A análise de farmacocinética não compartimental será aplicada à concentração versus tempo.

5. HISTOPATOLOGIA.

Em relação ao estudo histopatológico, foi encontrado o seguinte artigo de referência:
 Aragort De Rossell (2000) . BLOOD AND CULTURE TRYPOMASTIGOTES FORMS OF Trypanosomacruzi Y.: II PATHOLOGY OF CHAGAS' DISEASE IN BALB/C MICE. Descreve que:

Estudo patológico. Os camundongos foram necropsiados e a anatomia macroscópica dos órgãos foi estudada em relação aos controles normais mantidos nas mesmas condições do grupo experimental.

Estudo histopatológico. Foi realizada em amostras do aparelho digestivo (esôfago; estômago; duodeno; jejuno; íleo; cólon ascendente, transverso e descendente; ampola retal) e coração. As amostras foram fixadas em formalina neutra a 10%. Após a fixação do tecido, foi lavado em jato de água, desidratado em etapas sucessivas em concentrações crescentes de álcoois (70-80-90-100%), clarificado em xilol e incluído em parafina por passagem do tecido em 3 banhos do meio de inclusão. Os cortes entre 5 e 8 μ foram feitos em micrótomo American Optical Spencer "820" USA e corados com hematoxilina-eosina e giemsa-colofônia.

5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Seguem abaixo as atividades previstas e o cronograma para sua realização.

ATIVIDADES	CR													
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Marco	Abril	Maiο	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
ANO	2021													
Pesquisa Bibliográfica														
Redação da Introdução do trabalho														
Redação das Informações Técnicas														
Busca de protocolos														
Redação dos Controle de Qualidade														
Ensaio parasitológicos, farmacológicos, imagenológicos														
Compilação de resultados														
Ajustes e revisão final														
Defesa da Dissertação														
Prazo limite para finalização do curso														

6. REFERÊNCIAS

1. APT, W.; Zulantay, I. 2011. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev. Med. Chil. 139:247-257.
2. APT, W.; Heitmann, I.; Jersic, M.; Jofré, L.; Muñoz, P.; Hauck, I.; Normandin, A.; Rivera, M.; San Martín, A.; Sapunar, J.; Torres, M.; Zulantay, I. 2010. Guía clínica: “Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas”. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. pp. 2-35.
3. World Health Organization. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO; 2002. WHO Technical Report Series 905.
4. Breniere SF, Bosseno MF, Tellería J, Carrasco R, Vargas F, Yacsik N, Noireau F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53(2):179-84.
5. Sturm NR, Campbell DA. 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 115(1-2): 35-43.
6. Tibayrenc M, Ayala FJ. 1991. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. Parasitol Today 7(9): 228-232.
7. Tibayrenc M, Ayala FJ. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol 18(9): 405-410.
8. García, A. 2011. Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* y estudio epidemiológico molecular de clones involucrados en la infección transplacentaria Chile. Intra. Med. pp 2:1-6.
9. Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento ÁF, Diniz Lde F, Caldas IS, et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(11):e1870. doi: 10.1371/journal.pntd.0001870.
10. Good Clinical Practice Revisado 03 octubre 2020 extraído de <https://ichgcp.net/es/clinical-trials-registry/NCT02498782>)
11. Buchanan-Kilbey G, Djumpha J, Papadopoulou MV, Bloomer W, Hu L, Wilkinson SR, et al. Evaluating the developmental toxicity of trypanocidal nitroaromatic compounds on zebrafish. Acta Trop. 2013;128(3):701-5. doi: 10.1016/j.actatropica.013.07.022.
12. Menezes JC, Beatriz L, de Abreu PM, da Silva K, Martins C, Taylor JG. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of diaryldiazepines. Molecules. 2015;20:43-51. doi:10.3390/molecules20010043.
13. Díaz CA, Olea CA, Zapata GA, Lapier M, Mura F, Aguilera B, et al. Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2012;95:670-8. doi:10.1016/j.saa.2012.04.076.
14. Keenan M, Chaplin JH. A new era for chagas disease drug discovery? Prog Med Chem. 2015;54:185- 230. doi: 10.1016/bs.pmch.2014.12.001.
15. Santos KK, Matias EF, Tintino SR, Souza CE, Braga MF, Guedes GM, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. Exp Parasitol. 2012;131(1):130-2. doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.019.
16. OPS Organización Panamericana de la Salud. Información general: Enfermedad de Chagas, Revisado 04 de octubre 2020. Extraído de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es#:~:text=La%20enfermedad%20de%20Chagas%20o,21%20pa%C3%ADses%20de%20las%20Am%C3%A9ricas.)
17. Ministerio de Salud Bolivia 2007 Manual Operativo Manual de normas técnicas y operativas para el tamizaje, Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas Crónica reciente infantil)
18. Moll-Bernardes RJ, de Oliveira RS, de Brito ASX, de Almeida SA, Rosado-de-Castro PH, de Sousa AS. Can PET/CT be useful in predicting ventricular arrhythmias in Chagas Disease? J Nucl Cardiol. 2020 Jan 2. doi: 10.1007/s12350-019-02014-1. Epub ahead of print. PMID: 31898002.

19. Bernardes R, Rosado-de-Castro P. H., Cordeiro G., Nogueira F, Brito A., Silvestre Andrea- New Imaging Parameters to Predict Sudden Cardiac Death in Chagas Disease Trop. Med. Infect. Dis. 2020, 5, 74; doi:10.3390/tropicalmed5020074
20. Simoes M. Microvascular disturbances in Chagas heart disease. 1st. Virtual Congress of Cardiology, Argentina; 2002.
21. Zhang M, Jiang H, Zhang R, Xu H, Jiang H, Pan W, Li X, Wang Y, Wang S. Noninvasive evaluation of 18F-FDG/18F-FMISO-based Micro PET in monitoring hepatic metastasis of colorectal cancer . *Scientific Reports (2018) 8:17832* | DOI:10.1038/s41598-018-36238-x
22. Goncalves M.F., Umezawa E. S., Katzin A. M. et al., “*Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles,” *Experimental Parasitology*, vol. 72, no. 1, pp. 43–53, 1991.
23. Trocoli Torrecilhas A. C., Tonelli R. R., Pavanelli W. R. et al., “*Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response,” *Microbes and Infection*, vol. 11, no. 1, pp. 29–39, 2009.
24. Bayer-Santos E., Aguilar-Bonavides C., Rodrigues S. P. et al., “Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins,” *Journal of Proteome Research*, vol. 12, no. 2, pp. 883–897, 2013.
25. Torrecilhas A.C., Schumacher R. I., Alves M. J.M., and Colli W., “Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases,” *Microbes and Infection*, vol. 14, no. 15, pp. 1465–1474, 2012.
26. Cestari I., Ansa-Addo E., Deolindo P., Inal J. M., and Ramirez M. I., “*Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles,” *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 4, pp. 1942–1952, 2012.
27. Almeida I. C., Camargo M. M., Procópio D. O. et al., “Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents,” *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 7, pp. 1476–1485, 2000.
28. Ferguson M. A. J., “The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research,” *Journal of Cell Science*, vol. 112, no. 17, pp. 2799–2809, 1999.
29. Campos M. A. S., Almeida I. C., Takeuchi O. et al., “Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite,” *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 1, pp. 416–423, 2001.
30. Almeida I. C. and Gazzinelli R. T., “Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 70, no. 4, pp. 467–477, 2001.
31. MINSAL Chile, 2010. Guía Clínica “Guías de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas”. Santiago,. ISBN: Fecha de publicación: 2010 . Visto 09 noviembre 2020. Extraído de: https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518
32. CDC. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. Hoja informativa Visto: 10 noviembre 2020. Extraído de: [Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares](https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html#:~:text=La%20enfermedad%20de%20Chagas%20tiene,primeros%20meses%20de%20la%20infecci%C3%B3n. Esta página fue revisada el: 22 de diciembre de 2017. Fuente del contenido: Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria.33. Isaza S Maldonado J.E., Boshell J. 2012 Enfermedad de Chagas memorias Producido por: Ilandiba. Editorial: EMSA34. Apt W, Heitmann I, Jercic MI, Jofré L, Muñoz P, Noemí I, et al. Guías clínicas de la Enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. Rev Chil Infect 2008; 25: 189-93.35. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of <i>Trypanosoma cruzi</i> revisited. Int J Parasitol 2001; 5-6: 472-81.36. Graterol D., Arteaga R.Y., Castillo A., Díaz G., Mundaray O., Pineda W., Navarro M.C., Domínguez M.I., De Lima A.R., Contreras V.T. Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes. Rev. Salus. ISSN (Versión impresa): 1316-7138, 2013</div><div data-bbox=)

37. Velazco C., Puentes F. Moreno A. Patarroyo M, Murillo M., Puerta C. Adaptación de la cepa Munanta de *Trypanosoma cruzi* al cultivo in vitro en células vero Universitas Scientiarum Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana Vol 4(1): 83-94, 1997
38. Nogueira, N., Blanco, C. & COHN, Z. 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 142: 224-229
39. Rodriguez A. M., Aragort De Rossell R., De Jesus, R., Calcagno, M., Maizo De Segnini, Z., Segnini, S., Diaz, S. (2000). BLOOD AND CULTURE TRYPOMASTIGOTES FORMS OF *Trypanosoma cruzi* Y: I.- DIFFERENCE ON THE INFECTIVITY IN BALB/C MICE.. *Parasitología al día*, 24(1-2), 12-21. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-07202000000100002>
40. Aragort De Rossell, R., Rodriguez, A.M., De Jesus, R., Calcagno, M., Maizo De Segnini, Z., Diaz, S.. (2000). BLOOD AND CULTURE TRYPOMASTIGOTES FORMS OF *Trypanosomacruzi* Y.: II PATHOLOGY OF CHAGAS' DISEASE IN BALB/C MICE. *Parasitología al día*, 24(3-4), 79-87. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-07202000000300002>
41. Sorger D, Patt M, Kumar P, Wiebe LI, Barthel H, Seese A, Dannenberg C, Tannapfel A, Kluge R, Sabri O. [18F]Fluoroazomycinarabinofuranoside (18FAZA) and [18F]Fluoromisonidazole (18FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumors. Nucl Med Biol. 2003 Apr;30(3):317-26. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00442-0. PMID: 12745023.

7 COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

() NÃO DE APLICA

(X) NÚMERO E CÓPIA DA APROVAÇÃO ANEXA

8 COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA EM SERES HUMANOS

(X) NÃO DE APLICA

() NÚMERO E CÓPIA DA APROVAÇÃO ANEXA

9 COMITÊ DE BIOSSEGURANÇA

() NÃO DE APLICA

(X) NÚMERO E CÓPIA DA APROVAÇÃO ANEXO

CRONOGRAMA DE REUNIÕES, COM ORIENTADOR: PROFESSOR PhD. EMERSON SOARES BERNARDES

FECHA	HORA	LINKS DE REUNIÃO.
02-oct-20	17:00 PM	https://meet.google.com/fpi-knfp-bvn
16-oct-20	17:00 PM	https://meet.google.com/eic-guqv-hxt
30-oct-20	17:00 PM	https://meet.google.com/gsq-jxtv-kgx
09-nov-20	17:00 PM	https://meet.google.com/quf-ursb-hoz
21-nov-20	10:30 AM	https://meet.google.com/usd-fvff-ubb

NOME: LIZZ NATALY VILLARROEL FERNANDEZ
TEMA TESIS: CHAGAS