

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

CITOCINAS, CITOESQUELETO DE ACTINA E A P21 DE *Trypanosoma cruzi*
NA MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR DO PARASITO *IN VITRO*

Flávia Alves Martins

Uberlândia

Julho, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

CITOCINAS, CITOESQUELETO DE ACTINA E A P21 DE *Trypanosoma cruzi*
NA MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR DO PARASITO *IN VITRO*

Flávia Alves Martins

Dissertação submetida ao
Colegiado da Pós-graduação em
Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio
Vieira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo
José Barbosa Silva

Uberlândia

Julho, 2015.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M386c
2015 Martins, Flávia Alves,
 Citocinas, citoesqueleto de actina e a P21 de Trypanosoma cruzi na
 multiplicação intracelular do parasito in vitro / Flávia Alves Martins. -
 2015.
 68 f. : il.

 Orientador: Claudio Vieira da Silva.
 Coorientador: Marcelo José Barbosa Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
 Inclui bibliografia.

 1. Citologia - Teses. 2. Trypanosoma cruzi - Teses. 3. Chagas,
Doença de - Teses. 4. Citoesqueleto - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da.
II. Silva, Marcelo José Barbosa. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
IV. Título.

CDU: 581



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número 045/2014 do PPGBC

Data: 24 de julho de 2015

Discente: Flávia Alves Martins

Matrícula nº. 11312BCE001

Título do Trabalho: "Citocinas, citoesqueleto de actina e a P21 de *Trypanosoma cruzi* na multiplicação intracelular do parasito *in vitro*".

103
Às nove horas do dia vinte e quatro de julho de 2015 na sala 8C 223, do Bloco 8C - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Belchiorina Beatriz Fonseca/UFU, Álvaro Ferreira Júnior/UNIUBE e Cláudio Vieira da Silva/UFU, orientador do candidato. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva apresentou a Comissão Examinadora e a candidata Flávia Alves Martins; agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Flávia Alves Martins

aprovada

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva
UFU

Profa. Dra. Belchiorina Beatriz Fonseca
UFU

Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior
UNIUBE

*À minha mãe **Beatriz** e ao meu pai
José, os quais são responsáveis
pela minha força e determinação.
Ao meu noivo **Renato**, pela
paciência e dedicação.
À **Deus**, meu eterno guia e
salvador.*

Amo vocês!

Agradecimentos

Eu não poderia deixar de agradecer a todos que estiveram ao meu lado durante estes dois anos de Mestrado. Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças quando achei que não conseguiria, me sustentou em momentos difíceis, possibilitando, apesar dos problemas, que eu conseguisse ainda seguir firme nos meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, Beatriz e José, que mesmo não tendo toda a compreensão do que realmente faço, me apoiaram e são a base de tudo que sou. Amo vocês! Se vocês estão bem e felizes, eu também estarei.

Ao meu noivo e ‘amoreco’ Renato, que com sua paciência infinita, esteve sempre comigo. Meu companheiro, meu amigo, meu amor, que até pipetar, já pipetou! RSRS

A meus familiares e amigos, amo todos vocês!

Aos meus irmãos de trabalho do LATRI, já são tantos anos ao lado de vocês, que até já sabemos o que o outro está pensando somente de nos olharmos. Adele, Brunessa, Thaíse, Ana Flávia, Aline, Samuca, Marlus, Amanda, Rosi, Paula, Rebecca, Fabrício, Tatiana, João, Silvany e etc, muito obrigada pelo companheirismo e amizade.

A Mariani ‘do Confocal’, técnica da UFU, que sempre esteve disposta a auxiliar a todos, nunca deixando de lado o carisma e a atenção.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, por toda paciência, confiança e oportunidades concedidas. Obrigada por me aguentar durante esses 6 anos! E ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo José por ter aceitado o convite de última hora.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se o não fizerem ali?”

Fernando Pessoa

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta em torno de oito milhões de pessoas em todo o mundo. A doença se manifesta em duas fases, sendo a aguda caracterizada por alta parasitemia, e a crônica por controle da infecção por parte do hospedeiro. Uma resposta imune adequada é necessária para controle da infecção. O perfil de resposta frente à infecção por *T. cruzi* é do tipo T *helper* 1 (Th1). Estudos recentes demonstraram que as citocinas IL-3, IL-7 e IL-10 são altamente expressas na fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi*. As citocinas IFN- γ e IL-10 têm sido amplamente estudadas frente à infecção por *T. cruzi*, sendo que IFN- γ tem papel fundamental no controle da parasitemia na fase aguda. A proteína rP21 baseada da P21 de *T. cruzi*, induz a fagocitose inespecífica, polimeriza o citoesqueleto de actina e parece ter importância na passagem para a fase crônica da doença. Assim, nesse trabalho, avaliamos o papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na infecção *in vitro* por *T. cruzi*, e analisamos o papel das mesmas na polimerização de actina. Observou-se que em macrófagos peritoneais e em mioblastos C2C12, as citocinas IFN- γ , IL-7 e a proteína rP21, induzem a polimerização do citoesqueleto de actina. Além disso, em macrófagos e mioblastos infectados com a cepa G e Y, foi visto efeito diferencial das citocinas e da rP21 sobre a multiplicação parasitária. Porém, em todos grupos analisados, IFN- γ e rP21 diminuíram a multiplicação parasitária. Tal efeito pode ser devido à indução na polimerização de actina, juntamente com a indução da produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio pelos grupos tratados com IFN- γ . Enquanto isso, o efeito observado pela rP21 aparenta ter ligação apenas com o citoesqueleto de actina, onde a polimerização deste, atuaria na formação de uma barreira mecânica para a multiplicação parasitária. Sendo assim, é importante investigar os potenciais papéis do citoesqueleto de actina durante a multiplicação intracelular do parasita e sua interação com a resposta imune do hospedeiro, uma vez que o entendimento da modulação de tais propriedades forneceria base para melhor entendimento da biologia do parasita.

Palavras chaves : *Trypanosoma cruzi*, citoesqueleto de actina, multiplicação intracelular

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects about 8 million people worldwide. The disease is manifested in two phases, acute, characterized by high parasitaemia, and chronic by control of infection by the host. An adequate immune response is required to control infection. The response profile to infection by *T. cruzi* is the T helper type 1 (Th1). In recent studies, it was shown that the cytokines IL-3, IL-7 and IL-10 are highly expressed during the chronic phase of experimental infection by *T. cruzi*. The IFN- γ and IL-10 cytokines have been extensively studied to infection by *T. cruzi*, and IFN- γ plays a fundamental role in controlling parasitemia in the acute phase. The rP21 protein based on the P21 of *T. cruzi* induces nonspecific phagocytosis, polymerize actin cytoskeleton and seems to be matter in the passage to the chronic phase of the disease. Thus, in this study we analyzed the role of IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 cytokines and the rP21 protein on in vitro infection by *T. cruzi*, and analyzed the role of these cytokines in the polymerization of actin. It was observed on peritoneal macrophages and myoblasts C2C12, that the cytokines IFN- γ , IL-7 and rP21 protein, induce the polymerization of actin cytoskeleton. Moreover, in macrophages and myoblasts infected with G and Y strain was seen differential effect of cytokines and rP21 in the parasite multiplication. However, in all analyzed groups IFN- γ and rP21 decreased parasite multiplication. This effect may be due to the induction of actin polymerization, along with induction of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) for the groups treated with IFN- γ . Meanwhile, the observed effect of rP21 seems to be linked by only with the actin cytoskeleton where the polymerization thereof, act in forming a mechanical barrier for parasite multiplication. Therefore, it is important to investigate the potential role of the actin cytoskeleton during intracellular multiplication of the parasite and its interaction with the host's immune response once an understanding of the modulation of such properties, would provide a basis for better understanding of the biology of the parasite.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*; actin polymerization; intracellular multiplication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Viabilidade celular	23
Figura 2. Ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina.....	24
Figura 3. Análise da influência das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina de macrófagos peritoneais.....	26
Figura 4. Avaliação da influência das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina de mioblastos C2C12.....	28
Figura 5. Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina de macrófagos peritoneais.....	31
Figura 6. Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina de mioblastos C2C12.....	32
Figura 7. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária da cepa G de <i>T. cruzi</i> (TCT G) em macrófagos peritoneais.....	36
Figura 8. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, macrófago peritoneal infectado com cepa G de <i>T. cruzi</i> , 96 horas.....	37
Figura 9. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, macrófago peritoneal infectado com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , 96 horas.....	39
Figura 10. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, mioblastos C2C12 infectados com cepa G de <i>T. cruzi</i> , 96 horas.....	41
Figura 11. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, mioblastos C2C12 infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , 96 horas.....	43
Figura 12. Dosagem de óxido nítrico (NO).....	46
Figura 13. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Microgramas
µL	Microlitros
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
DAPI	4',6-diamino-2-fenilenoindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IgG	Imunoglobulinas G
IL-10	Interleucina 10
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-7	Interleucina 7
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kDa	Quilo Dalton
mL	Mililitros
NO	Óxido Nítrico
NOD-2	<i>Nucleotide- binding oligomerization domain containg 2</i>
N-WASP	Proteína Neuronal da Síndrome de Wislott- Aldrich
°C	Graus Celsius
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> pH 7,2
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% azida (NaN ₃)
PGN- Sap	Solução contendo PGN + 0,1% saponina
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
PPD	Parafenilenodiamina
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SFB	Soro fetal bovino
TCT	Tripomastigotas de cultura de tecidos
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i> (Tetrametil rodamina isotiocianato)
VERO	Fibroblastos de rim de macaco verde da África

Sumário

1.	Introdução	3
2.	Revisão da Literatura	3
2.1	Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
2.2	Envolvimento da resposta imunológica durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	7
2.3	Envolvimento da reestruturação do citoesqueleto da célula hospedeira durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	10
2.4	A proteína recombinante rP21	10
3.	Objetivos	13
3.1	Objetivo geral	13
3.2	Objetivos Específicos	13
4.	Material e Métodos	13
4.1	Cultura de células	13
4.2	Cultura de parasitos	14
4.3	Animais	14
4.4	Purificação da rP21	15
4.5	Viabilidade Celular	15
4.6	Ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina	16
4.7	Análise da influência das citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina	17
4.8	Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina	17
4.9	Análise do papel das citocinas IL-3, IL-7, IL-10, IFN- γ e da proteína da rP21 de <i>T. cruzi</i> na multiplicação parasitária	18
4.10	Dosagem de óxido nítrico (NO)	20
4.11	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	20
4.11	Normas de biossegurança	21
4.12	Análise estatística	21
5.	Resultados	22
5.1	Viabilidade Celular	22
5.2	Ensaio de Polimerização do Citoesqueleto de Actina	22
5.3	Análise da influência das citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina	25

5.4	Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina.....	29
5.5	Análise do papel das citocinas IL-3, IL-7, IL-10, IFN- γ e da proteína da rP21 de <i>T. cruzi</i> na multiplicação parasitária	34
5.6	Dosagem de óxido nítrico (NO).....	45
5.7	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	47
6.	Discussão	49
7.	Conclusão	59
8.	Referências Bibliográficas.....	59

1. Introdução

Na 15ª reunião da Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas, no ano de 2006, foi declarada a interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo vetor *Triatoma infestans* no território brasileiro (DE SOUZA, 2007). Entretanto, têm ocorrido nos últimos anos vários surtos de infecção humana por *Trypanosoma cruzi* por via oral no Brasil. No ano de 2012 a Secretaria de Saúde do Pará registrou 45 casos de pacientes com a infecção e uma morte em decorrência da mesma. Assim, constata-se a importância de se realizar estudos que contribuam para a elucidação da biologia de *T. cruzi*, e que permitam dessa forma, a elaboração de novas estratégias terapêuticas a fim de estabelecer o controle da transmissão da doença de Chagas.

Foi demonstrado por Rodrigues (2015), que as citocinas pró-inflamatórias IL-3, IL-7 e IFN- γ e a anti-inflamatória IL-10 (TETE et al., 2012), são altamente expressas durante a fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi*.

Por meio de resultados obtidos a partir de testes pilotos, verificamos que as citocinas acima mencionadas possuem a capacidade de diminuir a multiplicação parasitária *in vitro* em macrófagos peritoneais, quando infectados por tripomastigotas da cepa G. Além disso, a proteína rP21 de *T. cruzi*, que já foi caracterizada por induzir a polimerização do citoesqueleto e diminuiu a multiplicação parasitária de *T. cruzi* da cepa G em mioblastos C2C12 (MARTINS, 2013). Assim, este trabalho teve o objetivo de estabelecer a importância das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 e da proteína rP21 na infecção *in vitro* de *T. cruzi* e estabelecer sua relação com a polimerização do citoesqueleto de actina.

2. Revisão da Literatura

2.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* e representa um importante problema de saúde na América Latina, com aproximadamente oito milhões de pessoas infectadas (WHO, 2015). Recentemente, como consequência da migração

humana, a doença de Chagas tem se tornado um assunto de saúde pública em países desenvolvidos, com um aumento significativo de casos confirmados em países como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e no continente europeu (COURA E VIAS, 2010; ÁLVAREZ et al., 2014).

Carlos Chagas, em 1909, descreveu como ocorre a infecção no homem, a morfologia do parasita no sangue periférico, seu ciclo no tubo digestivo do vetor e a transmissão do parasita aos vertebrados por triatomíneos infectados (CHAGAS, 1909). Essa tríplice descoberta – transmissor, agente etiológico e doença – fez da sua descoberta um fato único na história da medicina (BRENER, 1989).

O protozoário flagelado *T. cruzi* pertence ao Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e apresenta três estágios evolutivos morfologicamente distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O processo de desenvolvimento de um estágio a outro é complexo, pois envolve mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico e inclui um hospedeiro invertebrado, o qual é o vetor biológico da doença, sendo representado principalmente por insetos hemípteros dos gêneros *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp. e *Panstrongylus* spp. pertencentes à Família Reduviidae, e um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) (BARRETO, 1979). O ciclo se inicia quando o inseto triatomíneo ingere formas tripomastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo, realizado em algum indivíduo infectado com *T. cruzi*. Quando esses parasitas atingem o intestino médio do vetor, se transformam em epimastigotas e passam a se multiplicar. Após algumas semanas, os epimastigotas migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Ao realizar novo repasto sanguíneo, os insetos depositam suas fezes contendo as formas tripomastigotas próximo ao local da picada. Assim, a penetração destes no hospedeiro vertebrado pode ocorrer diretamente pela mucosa, pelo orifício deixado pela punção realizada pelo inseto vetor ou quando o indivíduo coça o local, o que pode acarretar lesão tecidual e facilitar assim o alcance da corrente sanguínea pelos parasitas (BARRETO, 1979).

Dentro do organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos conseguem invadir vários tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam. No fim da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, as formas

amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas e lisam as células, podendo então infectar novas células (NAKAYASU et al., 2009).

Formas amastigotas de *T. cruzi* são comumente encontradas intracelularmente em células infectadas, porém podem também ser geradas de uma diferenciação extracelular de tripomastigotas. Estes amastigotas extracelulares compartilham marcadores morfológicos e imunoquímicos com seus correspondentes intracelulares, sendo capazes de invadir efetivamente células de mamíferos (FERNANDES et al., 2013).

A transmissão da doença de Chagas, além da forma vetorial, pode acontecer por transfusão sanguínea, transmissão congênita ou placentária, transplante de órgãos, infecções laboratoriais acidentais e por via oral (COURA, 2007; COURA, 2010). A transmissão oral de *T. cruzi* é provavelmente o mecanismo mais frequente no ciclo silvestre, considerando as várias espécies de animais silvestres, como pequenos mamíferos, os quais frequentemente ingerem insetos, neste caso, os triatomíneos transmissores de *T. cruzi* (COURA, 2015).

O primeiro trabalho descrevendo a transmissão de Chagas por via oral em humanos foi publicado em 1968, o qual relatou a ocorrência de um surto no município de Estrela- RS, onde 18 pessoas foram infectadas, e seis foram a óbito (SILVA et al., 1968; NERY-GUIMARÃES et al., 1968; COURA, 2015). No município de Navegantes (SC), no dia 13 de fevereiro de 2005, foi registrado outro surto da doença de Chagas. Dos 25 casos confirmados, três evoluíram para óbito. Foram capturados no local da transmissão, reservatórios silvestres (gambá) e o vetor invertebrado (*T. tibiamaculata*) da doença, ambos infectados por *T. cruzi* (STEINDEL et al., 2005). Em 2008, foram notificados 233 casos agudos da doença nos estados do Amapá (AP), Maranhão (MA) e Pará (PA), sendo a maioria devido à transmissão oral (PINTO et al., 2008). Desde então, vem ocorrendo vários casos de infecção oral, porém com menor repercussão (COURA, 2015).

A doença de Chagas manifesta-se em duas fases principais: aguda e crônica. A fase aguda é a inicial e pode durar até dois meses após a ocorrência da infecção. Essa fase é autolimitada, com parasitemia patente ou subpatente, a qual não é encontrada em vários indivíduos infectados. Estes podem apresentar um quadro assintomático ou sintomas inespecíficos. Menos de 50% das pessoas recém-infectadas apresentam os característicos primeiros sinais visíveis da infecção. Estes sinais podem incluir febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios linfáticos, dor muscular, dentre outros. Nesta fase os parasitas replicam ativamente em vários tipos celulares e tecidos

diferentes, incluindo macrófagos, tecido muscular liso, estriado esquelético e estriado cardíaco, adipócitos, e células do sistema nervoso central (BOMBEIRO et al., 2012; ÁLVAREZ et al., 2014; WHO, 2015).

Enquanto uma pequena proporção dos pacientes sucumbe à fase aguda da doença, o desenvolvimento da resposta imune adaptativa humoral e celular providencia o controle de infecção por *T. cruzi*. A falha na erradicação do parasita faz com que os indivíduos permaneçam infectados por toda a vida e estabeleçam um equilíbrio dinâmico com o parasita, o que resulta em diferentes manifestações clínicas (ÁLVAREZ et al., 2014).

Após a fase aguda, o paciente entra na fase crônica da infecção, podendo permanecer na forma indeterminada por vários anos e assim persistir indefinidamente. Nesta fase, o indivíduo não apresenta nenhum sintoma clínico relevante, e baixa ou nenhuma parasitemia. A distribuição tecidual de *T. cruzi* no hospedeiro é variável nos indivíduos infectados na fase crônica. Enquanto muitos indivíduos infectados permanecem na forma indeterminada da doença, uma proporção significativa (30-35%) de pacientes desenvolvem manifestações cardíacas ou digestivas da doença crônica: uma cardiomiopatia que pode levar à insuficiência cardíaca congestiva; arritmia; megaesôfago; megacólon e, eventualmente, a morte (WHO, 2015). Pacientes com cardiomiopatia e megaesôfago hospedam os parasitas no coração e esôfago, respectivamente. Estas manifestações patológicas são irreversíveis e ocorrem mesmo com a escassez do parasita (ÁLVAREZ et al., 2014).

Entretanto, a maioria dos pacientes apresenta a forma indeterminada da doença. Acredita-se que tais indivíduos apresentem ninhos de amastigotas em locais protegidos da resposta imune, uma vez que a persistência da infecção por *T. cruzi* é a regra. Tais locais podem variar desde a veia adrenal central (TEIXEIRA et al., 1997), tecido adiposo, estômago e colón (COMBS et al., 2005; FERREIRA et al., 2011; LEWIS et al., 2014).

T. cruzi apresenta alta variabilidade genética e biológica, e as diferentes cepas descritas podem diferir em sua morfologia, tropismo tecidual, virulência, patogenicidade, susceptibilidade aos agentes terapêuticos, composição antigênica dentre outras características (ANDRADE et al., 1999). Após extensiva revisão de literatura e avaliação das características biológicas, bioquímicas e de marcadores moleculares filogenéticos das diferentes cepas, pesquisadores classificaram *T.*

T. cruzi em seis subdivisões genéticas denominadas de DTUs (*discrete typing units*), sendo elas *T. cruzi* TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012). Os grupos TcI e TcII são considerados os primeiros ancestrais, sendo os demais grupos derivados destes dois (DA COSTA et al., 2014).

As cepas dos grupos TcI e TcII são considerado os maiores agentes causadores da doença de Chagas em todo mundo, especialmente a América do Sul, onde a doença e os dois grupos são os mais prevalentes. As cepas de TcI são caracterizadas por vários casos de miocardite aguda (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012), enquanto as formas cardíaca e digestiva da doença são mais comuns nas infecções causadas por cepas derivadas dos grupos TcII e TcIV. O grupo TcV é comumente encontrado na transmissão congênita da doença, enquanto cepas do grupo TcIII são raramente encontradas em infecções humanas (ZINGALES et al., 2012; DA COSTA et al., 2014).

Em nosso laboratório, trabalhamos principalmente com duas cepas de *T. cruzi*, as quais diferem principalmente quanto a infectividade. Tripomastigotas metacíclicos da cepa G (TcI) possuem baixa infectividade *in vivo*, enquanto tripomastigotas da cepa Y (TcII) são altamente infectivos *in vivo*. Estas duas cepas representam os dois maiores grupos genéticos de *T. cruzi* (MAGALHÃES et al., 2015).

2.2 Envolvimento da resposta imunológica durante a infecção por *T. cruzi*

Alguns autores têm mostrado em modelo experimental de infecção aguda em camundongos por *T. cruzi*, que a resposta T *helper* do tipo 1 (Th1) parece ter papel crucial no controle da infecção (MORAIS et al., 2015). O sistema imune é bem equipado para detectar e controlar a infecção por *T. cruzi*, por meio da combinação efetiva de diversos ramos da resposta imune. Células T CD4+, TCD8+ e linfócitos B, contribuem para o controle do parasita por meio da secreção de citocinas, toxicidade celular e produção de anticorpos específicos (RODRIGUEZ et al., 1981; ARAÚJO et al., 1989; TARLETON et al., 1992). No fim da fase aguda e início da fase crônica, anticorpos específicos IgG para *T. cruzi* participam ativamente da remoção dos

parasitas extracelulares liberados de células infectadas, um efeito que provavelmente ocorre pela promoção de fagocitose do parasita por macrófagos e neutrófilos (ÁLVAREZ et al., 2014).

Receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs) 2, 4, 7 e 9, receptores do tipo NOD 1 e NATCH, LRR e NLRP3 têm mostrado participar da detecção de *T. cruzi* por macrófagos e células dendríticas (ÁLVAREZ et al., 2014). No entanto, uma resposta imune deficiente devido à má sinalização dos PRR por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tem sido proposto como um mecanismo envolvido na evasão do parasita. Esta hipótese é baseada em dados que mostram que camundongos infectados com *T. cruzi* transgênico expressando a proteína flagelina (fliC) de *Salmonella typhimurium*, possuem um aumento da resposta imune adaptativa, mediada por macrófagos e células dendríticas, quando comparados a infecção com *T. cruzi* wild type (KURUP AND TALETON, 2013; ÁLVAREZ et al., 2014).

Em adição, anticorpos IgG específicos, medeiam a remoção de tripomastigotas circulantes no sangue, sendo que fagócitos mononucleares do fígado, baço e pulmão parecem estar envolvidos (UMEKITA et al., 1988; MOTA E UMEKITA, 1989; SARDINHA et al., 2006). O IFN- γ produzido pela ativação de células T CD4+ e CD8+ , células NK e células T CD4-CD8 $\gamma\delta$, possui importante papel na eliminação do parasita (CARDILLO et al., 1996; SARDINHA et al., 2006; ÁLVAREZ et al., 2014).

A citocina interferon-gama (IFN- γ) potencializa a atividade efetora dos macrófagos por indução da transcrição do gene produtor da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), notavelmente aumentando a produção de óxido nítrico, o qual possui importante efeito na morte de *T. cruzi* (MACCABE et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992). Em adição, o IFN- γ promove a mudança das imunoglobulinas para subclasse IgG, com alto potencial de opsonização e ativação do sistema complemento. Finalmente, a citotoxicidade de células T CD8+ também contribuem para o controle de *T. cruzi* por meio do reconhecimento e destruição de células que abrigam formas intracelulares do parasita (LOW et al., 1998; ÁLVAREZ et al., 2014).

A administração de IFN- γ à camundongos na fase aguda da doença reduz a parasitemia e impede a morte dos animais (REED, 1998). Enquanto isso, o tratamento com inibidores de óxido

nítrico resulta em aumento da parasitemia e da taxa de mortalidade dos camundongos infectados (VESPA et al., 1994; PETRAY et al., 1995).

Em estudo realizado por Rodrigues et al.,(2012a), camundongos infectados por amastigotas extracelulares da cepa G, apresentaram alta parasitemia quando deficientes em INF- γ e IL-12 (INF- $\gamma^{-/-}$, IL-12 $^{-/-}$). Esses resultados sugerem que a cepa G é sensível ao INF- γ produzido principalmente por células Natural Killer (NK), característico da resposta imune inata do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2012b).

O parasita consegue evadir dos mecanismos do sistema imune de várias formas. No início da infecção, tripomastigotas escapa da lise causada pelo sistema complemento, uma estratégia de evasão que resulta da presença de moléculas regulatórias do complemento na superfície do parasita (WENZEL et al., 2012). Em adição, parasitas internalizados de diversas cepas de *T. cruzi*, escapa do vacúolo parasitóforo formado nos macrófagos residentes (VANNIER-SANTOS, 2002), uma estratégia que depende de uma variedade de moléculas com propriedades antioxidantes (DESJARDINS AND DESCOTEAUX, 1997; DESCOTEAUX AND TURCO, 2002; DE MORAIS et al., 2014).

No entanto, com a progressão da infecção, estas duas estratégias são altamente contornadas pelo desenvolvimento de uma resposta humoral específica e pela indução da ativação dos macrófagos por IFN- γ e outras citocinas. Pelo fato das diferentes cepas de *T. cruzi* possuírem diferentes atividades antioxidantes, isto está diretamente relacionado com a virulência da cepa (HANDMAN AND GODING, 1985; DE MORAIS et al., 2015).

Células mononucleares derivadas de sangue periférico (PBMCs) de crianças na fase aguda da infecção, apresentaram alto perfil de expressão de RNA mensageiro para interferon (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e IL-10, com baixos níveis de IL-4 (SAMUDI et al., 1998; DE MORAIS et al., 2015). Crianças com doença de Chagas na fase crônica assintomática, apresentam alta expressão de IL-4. Isto sugere que seguido da ação da resposta Th1, há o balanceamento entre as respostas do tipo Th1 e Th2, a fim de suprimir a carga parasitária e proteger o hospedeiro de uma imunopatologia (BERN et al., 2011; SAMUDI et al., 1998; DE MORAIS et al., 2015).

2.3 Envolvimento da reestruturação do citoesqueleto da célula hospedeira durante a infecção por *T. cruzi*

O citoesqueleto de actina tem papel fundamental na célula durante o processo fagocítico e invasão celular por diferentes patógenos intracelulares (CASTELLANO et al., 2001). Assim, alguns patógenos desenvolveram fatores de virulência que os permitem interferir na dinâmica do citoesqueleto de actina da célula na finalidade de induzir sua internalização (CASTELLANO et al., 2001; NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). Como exemplo disso, as bactérias *Listeria* e *Yersinia* se ligam a proteínas de adesão da célula hospedeira induzindo a polimerização de actina e sua entrada na célula (CASTELLANO et al., 2001). Formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* induzem a agregação de filamentos de actina no sítio de adesão à célula hospedeira, formando estruturas semelhantes a taças as quais levam a internalização do parasito, mostrando que tais formas dependem da integridade do citoesqueleto de actina para obterem sucesso na invasão celular (MORTARA, 1991; PROCÓPIO et al., 1998).

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi possível verificar a importância de algumas proteínas associadas à polimerização de actina durante a infecção *in vitro* por amastigotas extracelulares de *T. cruzi*. A polimerização de actina mediada por ARF-6 (*ADP-ribosylation factor-6*), Anexina A2 e N-WASP exerce papel fundamental na invasão celular, enquanto que a ausência das mesmas propicia um ambiente favorável à multiplicação intracelular de amastigotas (CRUZ, 2010). Assim, acredita-se que a polimerização de actina exerce um papel de controle da replicação do parasita dentro da célula e, conseqüentemente, na propagação da doença. Além disso, foi possível verificar que a forma recombinante da proteína P21 (rP21) de *T. cruzi*, induz a polimerização da actina cortical em macrófagos peritoneais inflamatórios de *Calomys callosus*, bem como de camundongos C57BL/6 (RODRIGUES et al., 2012b).

2.4 A proteína recombinante rP21

Em 2009, Silva e colaboradores identificaram uma proteína de 21 kDa secretada por *T. cruzi*, a P21, estando a mesma envolvida na invasão celular por amastigotas e tripomastigotas

metacíclicos. A P21 é uma proteína ubíqua em *T. cruzi* cuja forma recombinante (rP21), adere à superfície de células HeLa de maneira dose-dependente. A utilização de anticorpos policlonais que se ligam à rP21 (proteína recombinante baseada na P21 de *T. cruzi*), inibem a invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos *in vitro*, enquanto a utilização da proteína recombinante juntamente tais formas do parasita, aumenta a invasão celular em células HeLa (SILVA et al., 2009).

Resultados recentes mostraram que a rP21 aumenta a fagocitose de partículas de zymosan e de parasitas intracelulares, por macrófagos peritoneais inflamatórios (RODRIGUES et al., 2012b). Tal aumento é devido à indução da via da PI3-kinase por esta proteína e, consequentemente, da polimerização de actina (RODRIGUES et al., 2012b). Vários estudos conduzidos em nosso laboratório indicaram o receptor de quimiocina CXCR4 como receptor da rP21 na célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012b), pois ao se tratar as células com a quimiocina SDF-1 alfa (ligante do CXCR4), houve a redução da quantidade de partículas de zymosan fagocitadas por macrófagos peritoneais.

Além disso, a rP21 solúvel possui as mesmas características e funções biológicas que a rP21 na sua forma insolúvel (SANTOS et al., 2014). Sabe-se que há uma diferença de expressão da P21 nas diferentes cepas de *T. cruzi* (FERNANDES, 2013) e o seu tráfego pelas vias endocíticas apresenta-se pouca colocalização com marcadores de vacúolos tardios em experimentos de cinética de internalização (MARTINS, 2013).

Ao se infectar patas de camundongos BALB/c com *Leishmania amazonensis* e posteriormente tratar localmente com rP21, foi visto um aumento da carga parasitária em relação ao grupo controle, além de um aumento da inflamação local possivelmente pelo recrutamento de células fagocíticas, uma vez que tais células são as principais hospedeiras de *L. amazonensis*. Além disso, a quantidade de IL-1 β foi maior em animais tratados com a rP21, sugerindo que o efeito da proteína na internalização dos parasitas pelas células hospedeiras, pode ter desencadeado um aumento na formação de inflamassomos, e consequentemente na produção da citocina IL-1 β , na tentativa de eliminar este patógeno (TEIXEIRA, 2014).

Em experimentos *in vivo* utilizando um modelo de implantação de esponja no dorso dos camundongos (BAILEY et al., 1988; GRINDLAY et al., 1951), diferentes quantidades de rP21 (10 μ g, 40 μ g ou 100 μ g) foram injetadas nos animais a cada 72 horas, durante nove dias. Dentre as

análises feitas, foi visto que a quantidade de hemoglobina foi significativamente reduzida no grupo tratado com a proteína recombinante, sugerindo que ela estaria agindo de maneira antiangiogênica, reduzindo a formação de vasos sanguíneos. Além disso, foi verificado o maior recrutamento de células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, as quais por meio da dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosamina (NAG), se mostraram mais ativas nos grupos tratados com a rP21 (MACHADO, 2014).

A rP21 aumenta o recrutamento de células hematopoiéticas na cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, confirmando o efeito quimiotático da proteína, por meio de sua ligação ao receptor CXCR4. Foi visto também, uma mudança no perfil das células inflamatórias recrutadas, mudando de polimorfonucleares para macrófagos e linfócitos ao longo do tempo de tratamento. Sugerindo assim um perfil de recrutamento semelhante ao que ocorre durante processos infecciosos no organismo (TREPAT et al., 2012; MACHADO, 2014).

Por meio do ensaio de invasão celular, foi confirmado mais uma vez, a capacidade quimiotática da rP21, uma vez que tal proteína apresenta capacidade de recrutar macrófagos peritoneais também por meio de um modelo de membrana basal. Quando se realiza o mesmo experimento com células de Ehrlich, um modelo utilizado para estudo do câncer de mama, é observado que a mesma não foi recrutada pela proteína recombinante (BORGES, 2015).

O fato de não ter ocorrido a invasão das células de Ehrlich no modelo de membrana basal, mas da rP21 ser capaz de recrutar células do sistema imune, como macrófagos, é um fator interessante no contexto de inibir o crescimento tumoral, e ao mesmo tempo recrutar células do sistema imune (EEROLA et al., 2000, YIN et al., 2003, GAO et al., 2008). Interessante notar que, apesar das células tumorais de mama, tanto humanas quanto de camundongo, expressarem o receptor CXCR4 (AZIM et al., 2012) a presença da rP21 não exerce efeito quimiotático como no macrófago. Este fato pode estar relacionado com a não ligação da rP21 ao CXCR4 ou com a possibilidade de que a interação rP21-CXCR4 possa desencadear diferentes eventos de sinalização intracelular em células tumorais, como as células de Ehrlich, podendo estar até mesmo bloqueando esse receptor (BORGES, 2015).

Foi visto também que o tratamento com a rP21 resulta em uma inibição do crescimento do tumor sólido de Ehrlich, porém sem alterar a viabilidade celular, sugerindo que a rP21 não atua interferindo na viabilidade das células tumorais diretamente. Contudo, ela poderia estar atuando

na modulação do microambiente tumoral, na tentativa de conter a progressão do tumor (BORGES, 2015).

Como mencionado anteriormente, a rP21 apresenta várias atividades biológicas, como aumento da invasão de amastigotas e tripomastigotas metacíclicos em células HeLa, indução da polimerização do citoesqueleto de actina, o recrutamento de células do sistema imune e atividade antiangiogênica. Assim, tentou-se estabelecer neste trabalho, a relação da proteína rP21 com a multiplicação parasitária de *T. cruzi* em tempos tardios, uma vez que a mesma pode ter papel na cronificação da doença de Chagas, contribuindo para a diminuição da carga parasitária, devido à barreira física intracelular formada pela polimerização do citoesqueleto de actina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 e da proteína rP21 sobre a multiplicação parasitária durante a infecção *in vitro* de *T. cruzi* das cepas G (*T. cruzi* I) e Y (*T. cruzi* II) e sua relação com a polimerização do citoesqueleto de actina.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Estudar o envolvimento de citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina em macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12.
- 2- Avaliar o papel da proteína rP21 e das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 sobre a multiplicação de *T. cruzi* das cepas G e Y e estabelecer sua relação com a polimerização do citoesqueleto de actina, indução da produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio.

4. Material e Métodos

4.1 Cultura de células

Foram utilizadas células Vero obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), para manutenção do ciclo de *Trypanosoma cruzi in vitro*. Além disso, também foram utilizados macrófagos peritoneais inflamatórios, retirados de camundongos C57BL/6, após 72 horas de estímulo com solução de tioglicolato a 3%; células C2C12 (mioblastos), os quais foram adquiridos a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para cultivo de todas as células foi utilizado *Dulbecco's modified Eagle's medium* - DMEM (Vitrocell/Embriolife), com L-glutamina (2mM) e D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (1100 mg/L), suplementado com os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L), e com soro fetal bovino – SFB, sendo 2% para células C2C12 e 10% para as demais células (Vitrocell/Embriolife). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.2 Cultura de parasitos

Formas tripomastigotas de cultura de tecido das cepas G e Y de *T. cruzi*, TCT G e TCT Y, respectivamente, foram mantidas em células Vero, com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Os parasitas foram periodicamente inoculados em camundongos C57BL/6 para manter a infectividade. Os parasitas foram mantidos juntamente com as células Vero, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.3 Animais

Camundongos C57BL/6, machos de seis a oito semanas de idade foram mantidos em condições padrões de temperatura (25 ± 2 °C) e iluminação (ciclo alternando 12 horas com luz-12 horas em ausência de luz), com alimento e água *ad libitum*. A manutenção e cuidado dos animais estavam de acordo com o Comitê de Ética de Laboratório Animal próprio da Instituição, sendo que os animais foram fornecidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CBEA-UFU). A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com os fundamentos internacionais de bem-estar animal, conforme Orientações da Associação Médica Veterinária em Eutanásia. Aprovação do comitê de ética em uso de animais nº 052/11.

4.4 Purificação da rP21

Por meio da técnica de cromatografia de afinidade por coluna de níquel e diálise contra PBS, já pré-estabelecidos por Silva et al., (2009), a purificação da proteína rP21 foi realizada e, para verificar a sua existência e pureza, um gel de poliacrilamida foi feito e a concentração da proteína foi dosada pelo método de Bradford (SILVA, et al., 2009, DOS SANTOS et al., 2013).

Por meio do gel de poliacrilamida é possível verificar a presença da banda correspondente à proteína de 21 kDa e, também, sua pureza. Pelo método de Bradford (BRADFORD, 1946), quando comparada à curva-padrão, foi possível quantificar a concentração da proteína presente após as purificações.

4.5 Viabilidade Celular

Para determinar se as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ e a proteína rP21 tinham efeito tóxico sobre as diferentes células utilizadas neste estudo, a viabilidade das células foi analisada pelo teste de Alamar Blue. A resazurina, princípio do Alamar Blue tem cor azul e não fluorescente, em células viáveis ela é reduzida à resofurin e passa então a apresentar cor rosa e fluorescente (ROLÓN et al., 2006, O'BRIEN et al., 2000).

Assim, macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de 96 poços, na quantidade de 1×10^5 / poço e 1×10^4 / poço, respectivamente. As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂, para adesão das células. No outro dia, o meio de cultura foi repostado contendo as diferentes citocinas nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/ mL, e a proteína rP21, na concentração de 40µg/ml. Para controle positivo de morte celular, foi utilizado meio de cultura mais DMSO a 30%.

Após 96 horas, foi adicionado em cada poço, resazurina filtrada, sendo 4 µL para as células C2C12 e 8 µL para os macrófagos peritoneais. As células foram mantidas em estufa, cobertas com papel alumínio e o tempo de reação da resazurina foi de 16 a 24 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Device, Sunnyvale, CA, EUA) a 594

nm, sendo a viabilidade celular expressa em porcentagem (%), considerando-se que o controle positivo, possuía 100% de viabilidade.

4.6 Ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina

O efeito das citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ na polimerização do citoesqueleto de actina foi avaliado por meio do kit *Actin Polymerization Biochem* (Cytoskeleton, Inc. Denver, CO, EUA). A polimerização do citoesqueleto de actina foi detectada pelo aumento na emissão de fluorescência do composto pireno muscular conjugado à actina. O aumento da fluorescência ocorre quando os monômeros de actina globular (G-actina), que estão conjugados ao pireno, formam a actina filamentosa (F-actina) indicando a polimerização do citoesqueleto de actina. A fluorescência é medida no comprimento de onda de excitação de 350 ou 360 \pm 20 nm e emissão de 407 ou 410 \pm 10 nm ou 420 \pm 20 nm. Como controle negativo da reação de polimerização, é utilizado apenas o *G-Buffer* do kit, composto pelo *General Actin buffer* e ATP. Como controle positivo da polimerização utilizou-se *G-Buffer* juntamente com o fluoróforo pireno muscular. Para esta avaliação, foram utilizadas as diferentes citocinas na concentração de 10 ng/mL. Como indicado pelo protocolo do fabricante, em placas pretas de 96 poços foram colocados os controles tanto negativo quanto controle positivo da reação e, além disso, também utilizou-se PBS 1x como controle. A captação da fluorescência emitida pelo pireno foi feita no espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices).

Inicialmente, foi distribuído *G-Buffer* em todos os poços, sendo o pireno muscular ausente no controle negativo e presente nos demais poços. Posteriormente, foi realizada leitura da placa por 3 minutos, com intervalo de 60 segundos entre cada ciclo, para estabelecer a *baseline* de fluorescência dos compostos. Foi feita uma pausa na leitura e acrescentado então ao *G-buffer* com pireno: PBS e as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ na concentração de 10 ng/mL. Assim, realizou-se novamente uma leitura de 20 minutos no espectrofotômetro, com intervalo de 60 segundos entre cada ciclo para analisar se as citocinas por si, já influenciavam a polimerização dos monômeros de G-actina.

Posteriormente, foi adicionado em todos os poços, o *buffer* de polimerização de actina e a placa foi mantida no espectrofotômetro por 60 minutos, para análise da cinética de polimerização

dos monômeros de actina. Para leitura das placas, foi utilizado o espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) e o programa *SoftMax Pro*.

4.7 Análise da influência das citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina

A polimerização do citoesqueleto de actina foi avaliada em macrófagos peritoneais inflamatórios e em mioblastos C2C12. Tais células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro, onde os macrófagos foram semeados na quantidade de 1×10^5 / poço e as células C2C12 na quantidade de 1×10^4 /poço, sendo posteriormente incubadas *overnight* para melhor adesão. No outro dia, os poços foram lavados com PBS e foi reposto o meio de cultura DMEM contendo ou não as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ na concentração de 10 ng/mL (já previamente padronizada) ou a proteína rP21 na concentração de 40 μ g/mL. As células tratadas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 96 horas, o sobrenadante das células foi retirado e congelado para posterior dosagem de óxido nítrico. As lamínulas foram fixadas com formaldeído 4% por 1 hora, posteriormente os filamentos de actina das células foram marcados na cor vermelha com Faloidina (*Fluorescein isothiocyanate labeled TRITC -phalloidin-* Sigma-Aldrich: P5282), na proporção 1:1000 em PGN-saponina e o núcleo das células, com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), na proporção de 1:500 em PGN-saponina.

As lamínulas foram incubadas em câmara úmida e escura durante uma hora e em seguida lavadas três vezes com PBS 1x. Assim, as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente *anti-fading*). As imagens foram adquiridas em aumento de 63x, através de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagens. As imagens foram analisadas quanto à fluorescência pelo programa *Image J*.

4.8 Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina

Macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de seis poços na quantidade de 1×10^6 /poço e 1×10^5 /poço, respectivamente. Tais células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ e foram deixadas *overnight* para aderirem. No outro dia, o meio foi repostado contendo ou não as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ (10 ng/ml) e a proteína rP21 (40 μ g/ml). No caso do tratamento com a rP21, o meio presente nos poços foi substituído diariamente por novo meio contendo tal proteína na concentração supracitada. As células tratadas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 96h de tratamento, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e as células foram desaderidas com a utilização de *cell scraper* e fixadas em formaldeído 4% por pelo menos uma hora, lavadas com PBS e colocadas em solução de PBS+Gelatina 0,25%+Azida Sódica 0,1% (PGN) por 3 horas.

Para marcação dos filamentos de actina, as células foram incubadas com Faloidina (*Fluorescein isothiocyanate labeled TRITC -phalloidin*- Sigma-Aldrich: P5282) 1:1000 em PGN-saponina. As células em suspensão ficaram incubadas com a solução supracitada em câmara escura *overnight*, sendo posteriormente centrifugadas e lavadas com PBS. Após a última lavagem, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200 μ l de PBS, sendo a amostra depositada em tubos de ensaio de fundo redondo para análise no citômetro GuavaeasyCyte, Guava Technologies, Millipore. Os resultados da citometria foram analisados pelos programas *CytosoftBlue* e *GraphPad Prism* 6.01 (<http://www.graphpad.com/>).

4.9 Análise do papel das citocinas IL-3, IL-7, IL-10, IFN- γ e da proteína da rP21 de *T. cruzi* na multiplicação parasitária

Para padronização da concentração das citocinas a ser utilizada, e do melhor tempo para avaliar a multiplicação, macrófagos peritoneais inflamatórios obtidos a partir de camundongos C57BL/6 foram plaqueados na quantidade de 1×10^5 / poço em placas de 24 poços, contendo lamínulas circulares de 13 mm. No outro dia, estas células foram infectadas com tripomastigotas de cultura de tecido da cepa G (TCT G) de *T. cruzi* na proporção de 1 parasita a cada duas células. Após 3 horas de infecção, os poços foram lavados e o meio de cultura foi repostado, contendo ou não as citocinas nas concentrações de 10, 40 e 100 ng/mL. As células infectadas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 72, 96 e 120 horas de multiplicação, as células

foram fixadas com Bouin por 15 minutos e coradas com Giemsa por uma hora. As lâminas foram montadas, e a contagem quantificou o número de parasitas intracelulares em 100 células infectadas. Com base neste experimento, padronizamos a concentração das citocinas a ser utilizada nos demais experimentos para 10 ng/mL, e o tempo de 96 horas para análise da multiplicação.

Após a padronização, a análise da multiplicação parasitária foi avaliada em macrófagos peritoneais e em mioblastos C2C12. Tais células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm, onde os macrófagos foram semeados na quantidade de 1×10^5 / poço e as células C2C12 na quantidade de 1×10^4 / poço, sendo incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para melhor adesão. No outro dia, as células foram infectadas por formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) das cepas G (TCT G) e Y (TCT Y) de *T. cruzi*, na quantidade de um parasito a cada duas células para macrófagos peritoneais e cinco parasitos por células, no caso de mioblastos C2C12. Após 3 horas, os poços foram lavados três vezes com PBS e foi repostado o meio de cultura contendo ou não as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ na concentração de 10 ng/mL ou contendo a proteína rP21 na concentração de 40 μ g/ml. No caso do tratamento com a rP21, o meio presente nos poços foi substituído diariamente por novo meio contendo tal proteína na concentração supracitada. Além disso, o tratamento com a rP21 ocorreu de duas maneiras diferentes, na primeira, o meio contendo a rP21 foi adicionado logo após o período de infecção, e na segunda, a rP21 foi adicionada 24 horas pós-infecção (rP21 24h). As células infectadas e tratadas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após 96h de tratamento, o sobrenadante dos poços foi recolhido para posterior dosagem de óxido nítrico, e as lamínulas foram fixadas em formaldeído 4%. Os filamentos de actina foram marcados na cor vermelha com Faloidina (*Fluorescein isothiocyanate labeled TRITC - phalloidin*- Sigma-Aldrich: P5282), na proporção 1:1000 em PGN-saponina e o núcleo das células e dos parasitas, com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), na proporção de 1:500 em PGN-saponina. As lamínulas foram incubadas em câmara úmida e escura durante uma hora, sendo posteriormente lavadas três vezes com PBS 1x.

Assim, as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente *anti-fading*). As imagens foram adquiridas em aumento de 63x, por meio de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M,

acoplado com sistema de aquisição de imagens. As análises foram feitas de modo a se contabilizar a porcentagem (%) de células infectadas, o número médio de parasitas/célula, e o número total de parasitas existentes nas células infectadas.

4.10 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (1982), que consiste na detecção de nitrito (NO_2^-), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se à uma placa de 96 poços 50 μl do sobrenadante de cultura em triplicata, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 2,5% (solução A) e de N-1-naphtyleththylenodiamina, também diluído em solução de H_3PO_4 a 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μM passou por diluições seriadas (fator 2) em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 450 nm. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão, e os resultados obtidos expressos como a média da triplicata \pm desvio padrão.

4.11 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para dosagem de espécies reativas de oxigênio (ROS), macrófagos peritoneais inflamatórios obtidos a partir de camundongos C57BL/6 e mioblastos C2C12, foram plaqueados em placas pretas de 96 poços de fundo chato, sendo os macrófagos semeados na quantidade de 1×10^5 / poço e as células C2C12 na quantidade de 1×10^4 / poço, sendo deixadas *overnight* para melhor adesão em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . No outro dia, as células foram infectadas por formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) das cepas G e Y de *T. cruzi*, na quantidade de um parasito a cada dois macrófagos e cinco parasitos para cada célula C2C12.

Após 3 horas, os poços foram lavados três vezes com PBS e foi repostado o meio de cultura contendo ou não as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ na concentração de 10 ng/mL ou contendo a proteína rP21 na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No caso do tratamento com a rP21, o meio presente nos poços foi substituído diariamente por novo meio contendo tal proteína na

concentração supracitada. Além disso, o tratamento com a rP21 ocorreu de duas maneiras diferentes, na primeira, o meio contendo a rP21 foi adicionado logo após o período de infecção, e na segunda, a rP21 foi adicionada 24 horas pós-infecção (rP21 24h). As células infectadas e tratadas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após 96 horas de infecção, o meio de todos os poços foi retirado e foi adicionado meio de cultura sem o indicador de pH vermelho de fenol, com a sonda 2',7'- *dichlorofluorescein diacetate* (DCFH-DA) diluída a 1-2 µM. Para controle do funcionamento da sonda, foi utilizado um controle negativo de produção de ROS, onde as células foram previamente incubadas com NAC (N-acetilcisteína) a 10mM por 1 hora. Para controle positivo, as células foram pré-incubadas com LPS (lipopolissacarídeos) na concentração de 1µg/mL, por 1 hora. Para todos os tratamentos foi utilizado um controle negativo, onde foi adicionado o meio de cultura com ausência de sonda. Após 1 hora da adição da sonda, as placas foram lidas em espectrofotômetro GloMax®, no comprimento de onda de excitação e emissão, 485-495 e 520-530, respectivamente.

4.11 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos que foram realizados neste estudo, bem como a utilização de equipamentos, seguirão as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

4.12 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA, com pós-teste Bonferroni, pelo GraphPad Prism (©2015 GraphPad Software, Inc.) versão 6.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Viabilidade Celular

A fim de averiguar se as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ e a proteína rP21 tinham efeito tóxico sobre as diferentes células usadas nesse estudo, a viabilidade das células foi analisada pelo teste de Alamar Blue. Como controle positivo de morte, foi utilizado meio de cultura contendo DMSO a 20%.

Os experimentos de viabilidade celular, mostraram que após 96 horas de incubação dos macrófagos peritoneais juntamente com as citocinas nas diferentes concentrações, 1, 10 e 100 ng/mL, e com a proteína rP21 na concentração de 40 μ g/mL, apenas a citocina IFN- γ na concentração de 100ng/mL apresentou toxicidade significativa (figura 1-A).

Assim, como podemos ver na figura 1-B, as demais concentrações de IFN- γ , citocinas, e a proteína rP21, não alteraram a viabilidade celular no tempo analisado. De forma similar, o ensaio de viabilidade em mioblastos C2C12 demonstrou que as diferentes concentrações das citocinas e da proteína rP21 não gerou toxicidade celular significativa.

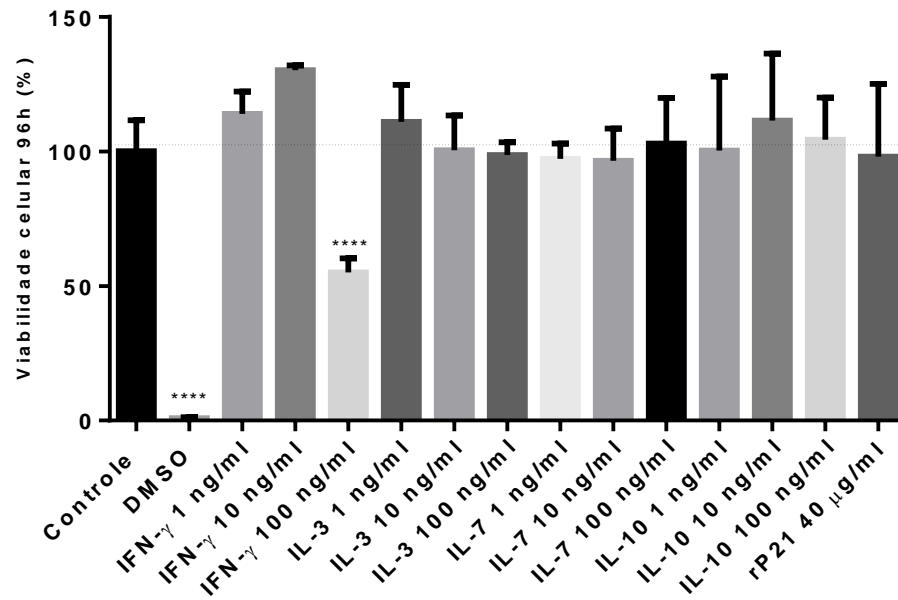
5.2 Ensaio de Polimerização do Citoesqueleto de Actina

O efeito das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 na polimerização do citoesqueleto de actina foi avaliado por meio do kit *Actin Polymerization Biochem* (Cytoskeleton, Inc. Denver, CO, EUA). A polimerização do citoesqueleto de actina foi detectada pelo aumento na emissão de fluorescência do composto pireno muscular conjugado à actina. O aumento da fluorescência ocorre quando os monômeros de actina globular (G-actina), que estão conjugados ao pireno, formam a actina filamentosa (F-actina) indicando a polimerização do citoesqueleto de actina. A captação da fluorescência emitida pelo pireno foi feita pelo espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices).

Assim, o ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina, foi realizado conforme sugerido pelo fabricante do *Actin Polymerization Biochem Kit*. A análise da cinética de polimerização dos monômeros de G-actina, mostrou que apenas os tratamentos com as citocinas IFN- γ e IL-7, foram capazes de aumentar a formação dos filamentos em relação ao controle positivo, tal característica se manteve ao longo do tempo (60 minutos) analisado (figura 2-A).

A figura 2-B, mostra a quantificação da área do gráfico existente entre a curva de polimerização de actina de cada tratamento, e a base do eixo X. Dessa forma, podemos observar que a área está aumentada significativamente quando se realizou o tratamento com a citocina IFN- γ (10ng/mL) e com IL-7 (10 ng/mL). Neste experimento, não verificamos o efeito da incubação dos monômeros de G- actina com a proteína rP21, uma vez que tal análise já havia sido realizada em outro trabalho. No mesmo, foi verificado aumento significativo da formação de filamentos de actina, devido a incubação com a proteína rP21 (BORGES, 2015).

A



B

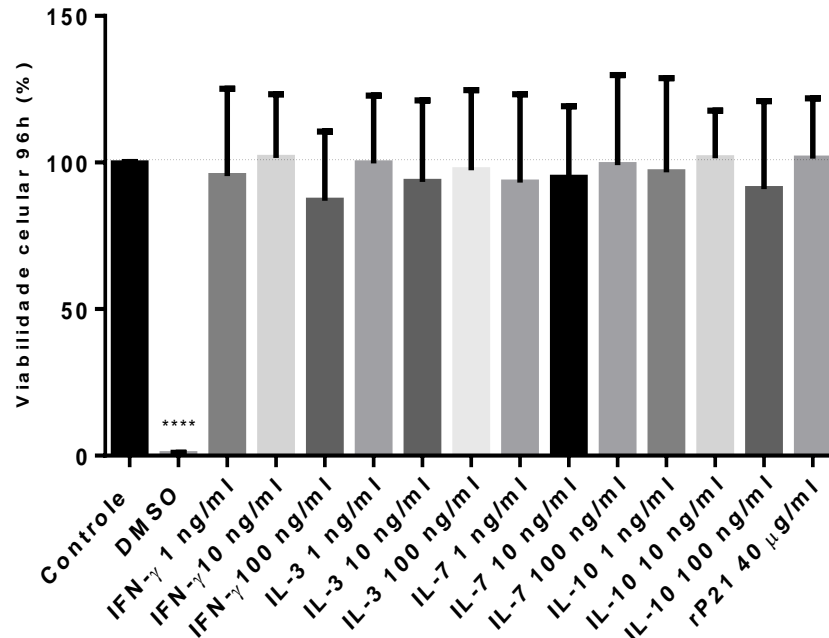


Figura 1. Viabilidade Celular. (A) Macrófagos peritoneais incubados por 96 horas com as diferentes citocinas nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL e com a proteína rP21 na concentração de 40 μ g/mL. (B) Mioblastos C2C12 incubados por 96 horas com as diferentes citocinas nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL e com a proteína rP21 na concentração de 40 μ g/mL. ****p<0,0001.

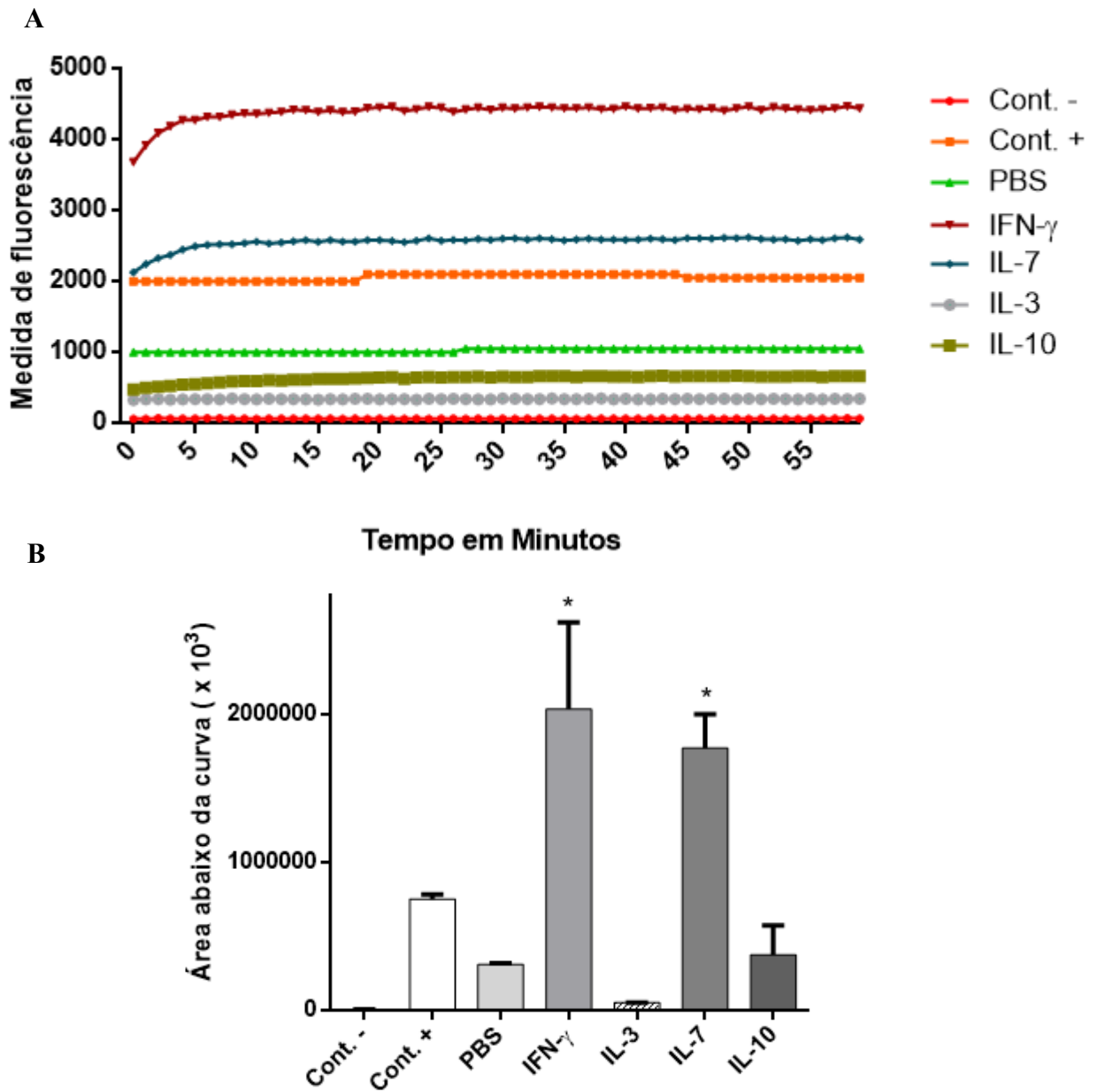


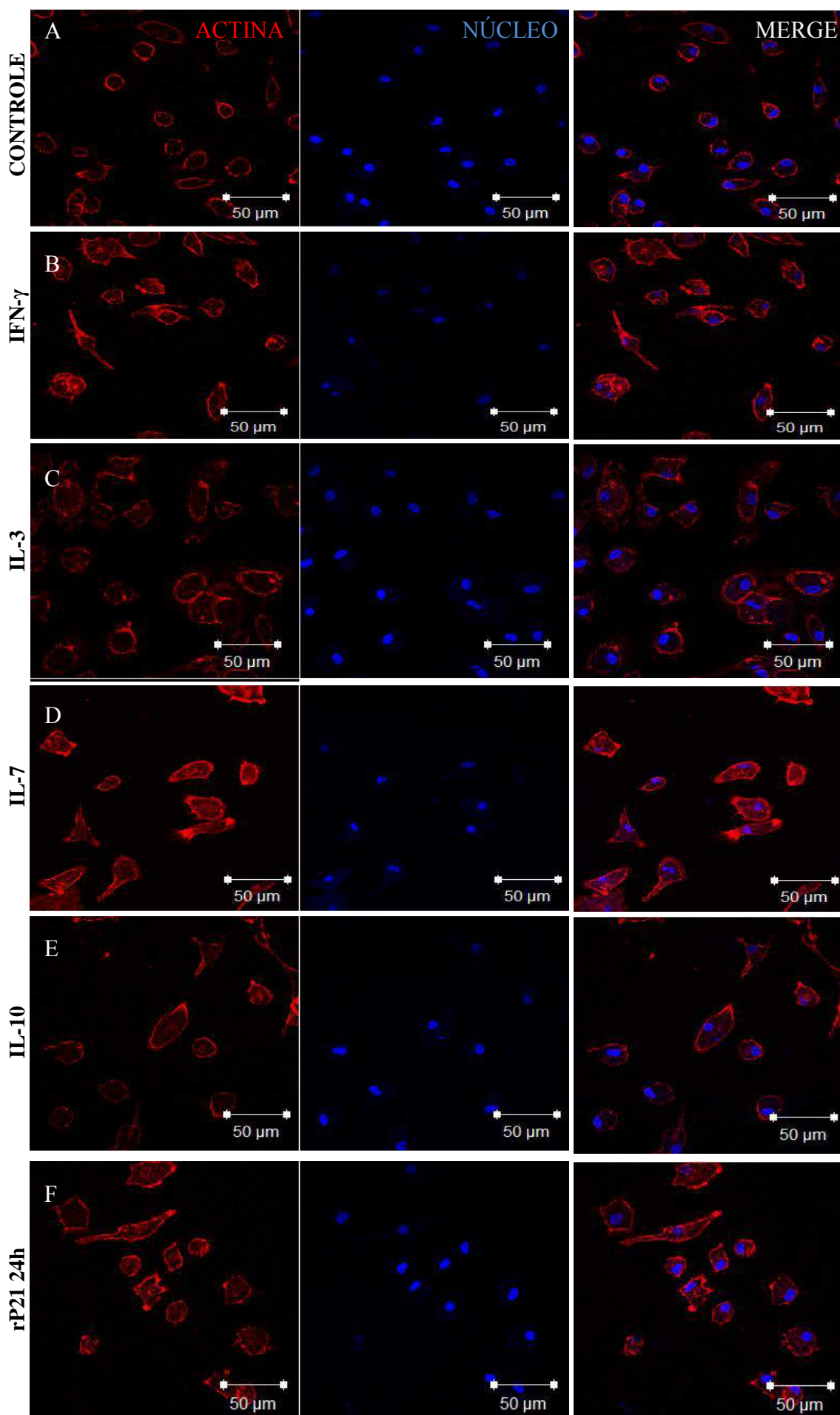
Figura 2. Ensaio de Polimerização do Citoesqueleto de Actina. (A) Cinética de polimerização dos monômeros de G-actina contendo os diferentes tratamentos, em F-actina. Medida de fluorescência realizada a cada minuto, total de 60 minutos. (B) Área do gráfico existente entre a curva de polimerização e a base do eixo X.

5.3 Análise da influência das citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina

Para confirmar se as citocinas utilizadas neste trabalho exerciam alguma influência na polimerização de actina das células, macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram plaqueados e incubados por 96 horas com as citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10. Porém em relação ao tratamento com a rP21, as células também foram incubadas por 96 horas, sendo que o meio contendo a rP21 foi repostado a cada 24 horas.

A concentração utilizada das citocinas e da rP21 foi de 10 ng/mL e 40 μ g/mL, respectivamente. Assim, conforme podemos ver nas diferentes imagens contidas na figura 3 (A-F), a marcação dos filamentos de actina (na cor vermelha), se apresenta aumentada somente quando se realiza o tratamento com a citocina IFN- γ e a proteína rP21. De modo contrário, o tratamento com a citocina IL-10, diminuiu significativamente a polimerização de actina. A intensidade de fluorescência foi quantificada por meio do programa *ImageJ* e está representada na figura 3-G.

Mioblastos C2C12 também foram incubados com as citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 por 96 horas, e com a proteína rP21 por 24 horas. É possível observar na figura 4 (A-F), que dentre os diferentes tratamentos realizados, a intensidade da marcação dos filamentos de actina (cor vermelha), se mostrou aumentada de forma significativa nos tratamentos com as citocinas IFN- γ , IL-7 e a proteína rP21 24h. A intensidade da fluorescência emitida pelos filamentos de actina está representada na figura 4-G.



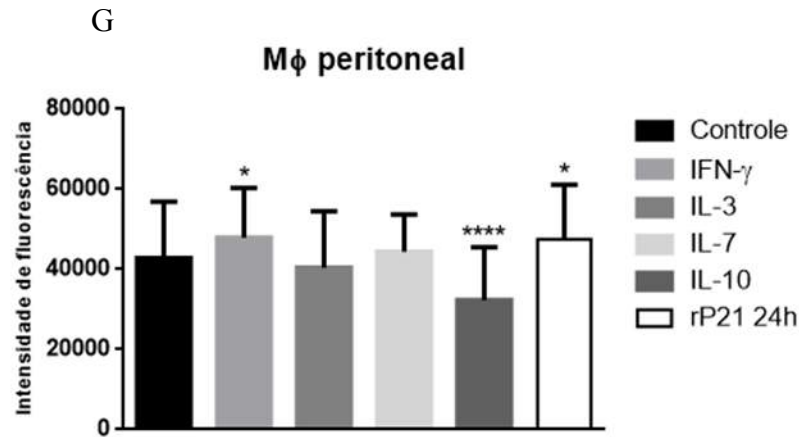
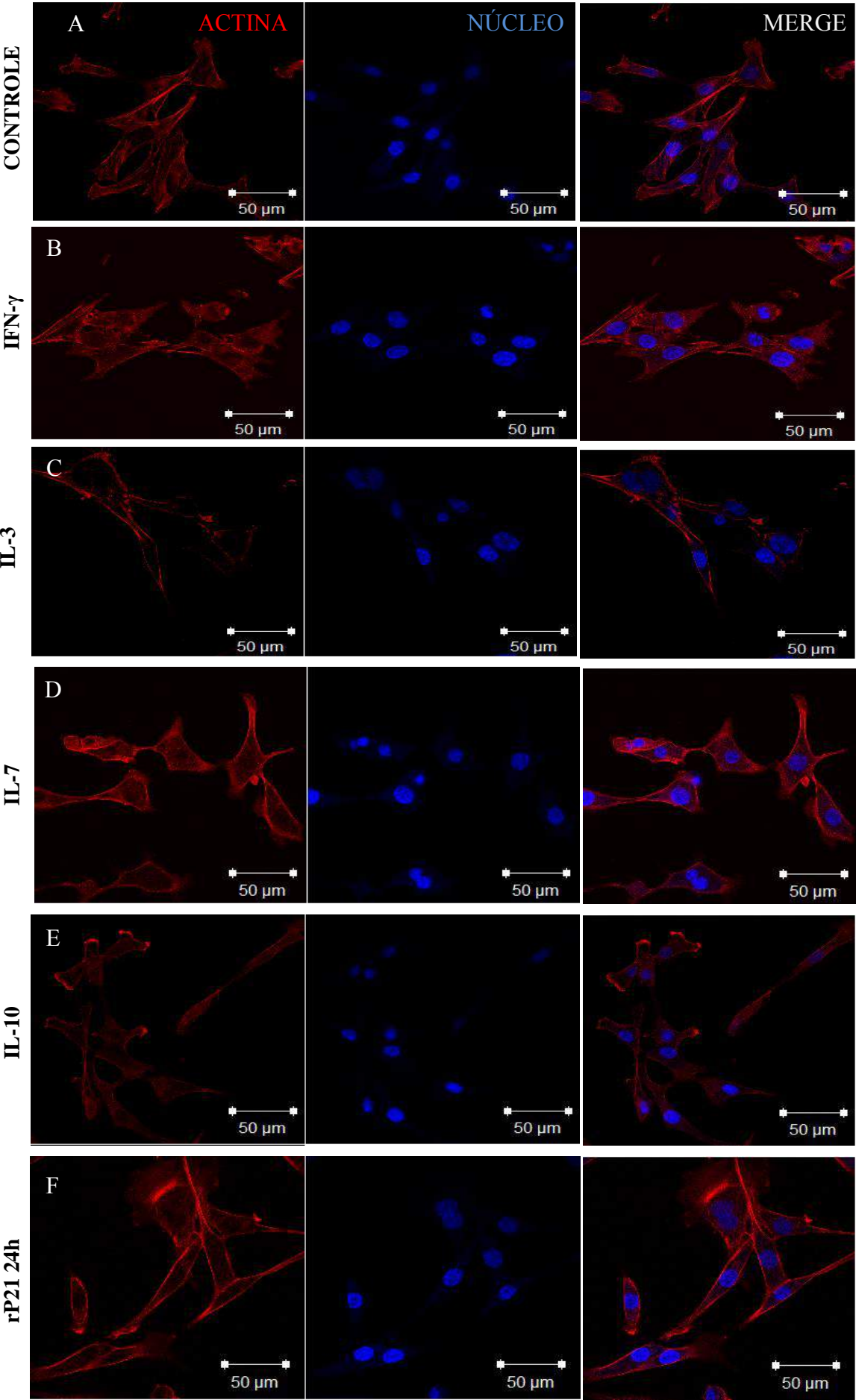


Figura 3. Análise da influência das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina de macrófagos peritoneais. (A) Macrófagos peritoneais sem tratamento. (B) Macrófagos peritoneais tratados com IFN- γ na concentração de 10 ng/mL. (C) Macrófagos tratados com IL-3 na concentração de 10 ng/mL. (D) Macrófagos tratados com IL-7 na concentração de 10 ng/mL. (E) Macrófagos tratados com IL-10 na concentração de 10 ng/mL. (F) Macrófagos tratados com rP21 na concentração de 40 μ g/mL. (G) Intensidade de fluorescência emitida pela polimerização de actina em relação aos diferentes tratamentos. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.



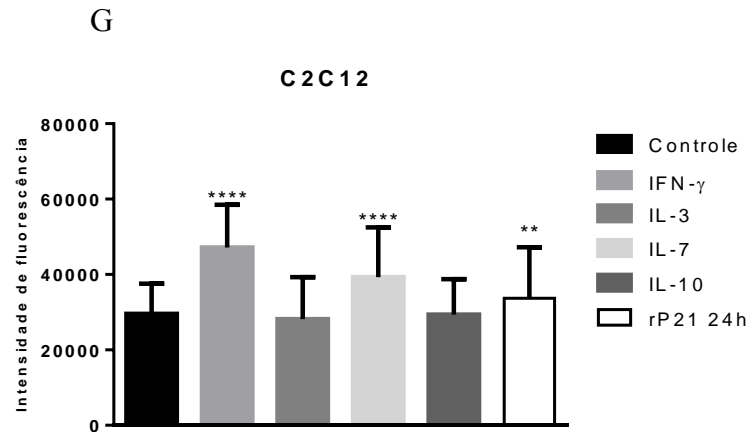
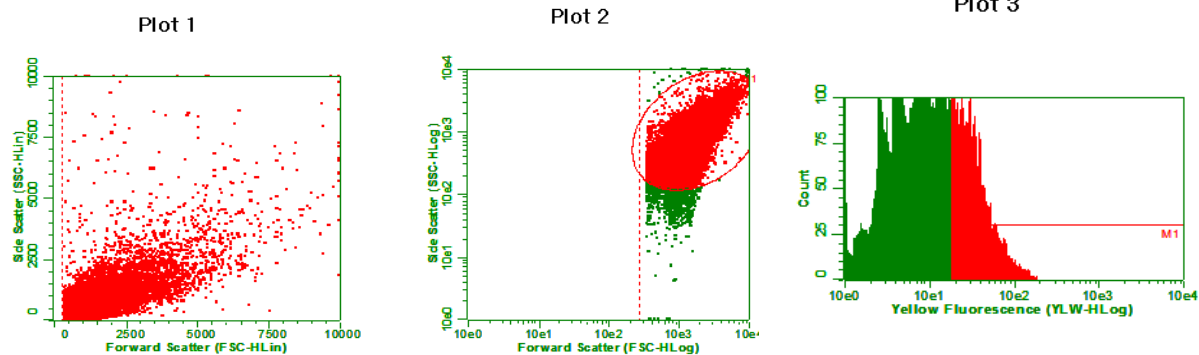
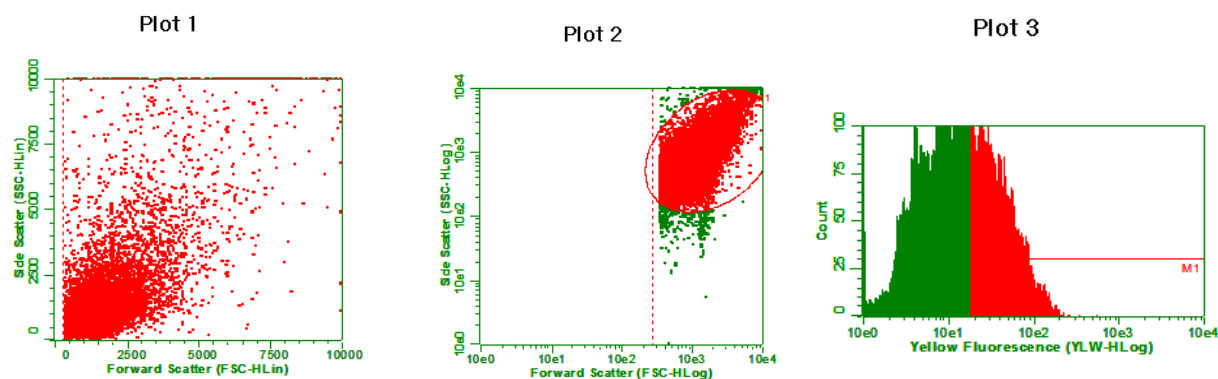
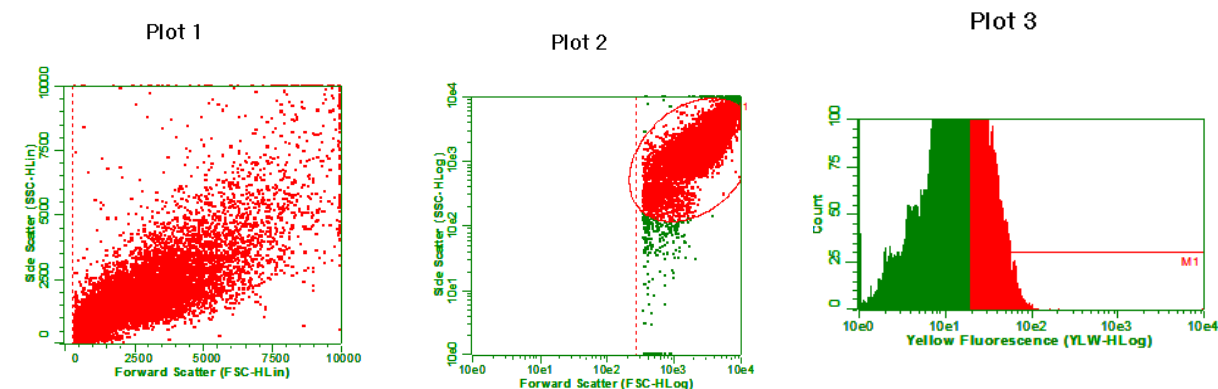
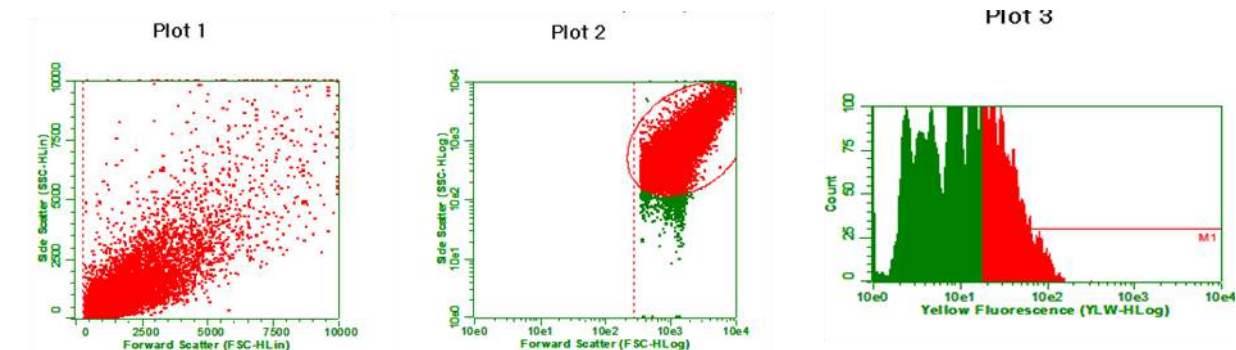


Figura 4. Análise da influência das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina de mioblastos C2C12. (A) Mioblastos C2C12 sem tratamento. (B) Mioblastos C2C12 tratados com IFN- γ na concentração de 10 ng/mL. (C) Mioblastos C2C12 tratados com IL-3 na concentração de 10 ng/mL. (D) Mioblastos C2C12 tratados com IL-7 na concentração de 10 ng/mL. (E) Mioblastos C2C12 tratados com IL-10 na concentração de 10 ng/mL. (F) Mioblastos C2C12 tratados com rP21 na concentração de 40 μ g/mL. (G) Intensidade de fluorescência emitida pela polimerização de actina em relação aos diferentes tratamentos. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5.4 Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina

Na tentativa de confirmar os resultados obtidos nos experimentos anteriores, utilizou-se da técnica de citometria de fluxo para quantificação da intensidade de fluorescência emitida pelas células sob os diferentes tratamentos. Para tal, macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram plaqueados e no outro dia, o meio foi repostado contendo ou não as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ (10 ng/ml) e a proteína rP21(40 μ g/ml). No caso do tratamento com a rP21, o meio presente nos poços foi substituído diariamente por novo meio contendo tal proteína na concentração supracitada.

Foi observado que macrófagos peritoneais, submetidos aos diferentes tratamentos, apresentaram a polimerização de filamentos de actina aumentada apenas quando incubados com a citocina IFN- γ , sendo que os demais tratamentos não aumentaram significativamente a polimerização dos filamentos de actina (figura 5). Em relação aos mioblastos C2C12, é possível observar na figura 6, que houve aumento significativo da polimerização do citoesqueleto de actina, quando as células foram submetidas ao tratamento com IFN- γ , IL-7, IL-10 e rP21.

A - CONTROLE**B- IFN- γ** **C - IL-3****D - IL-7**

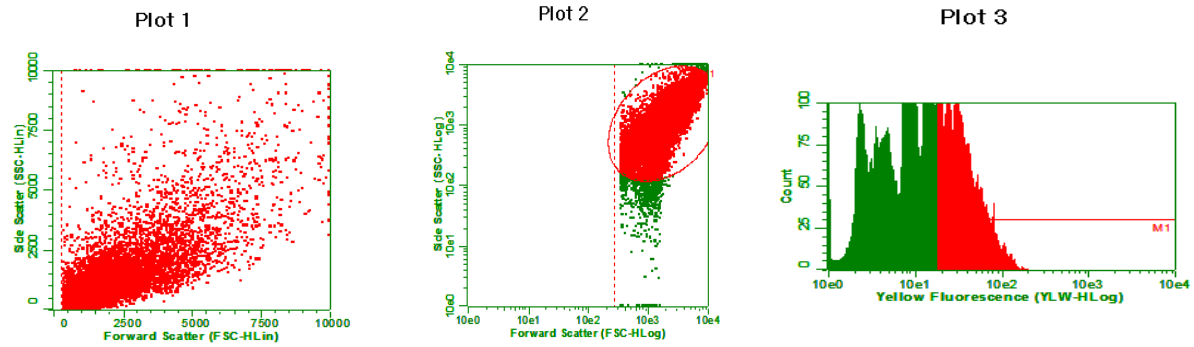
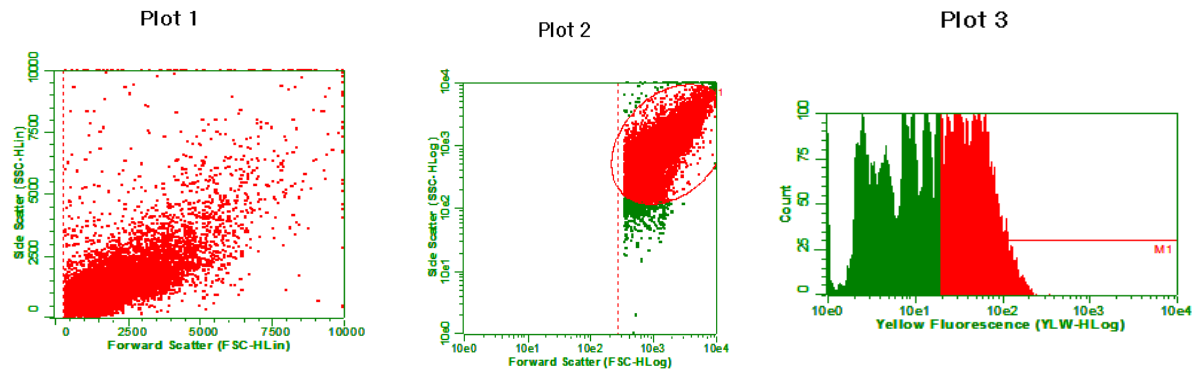
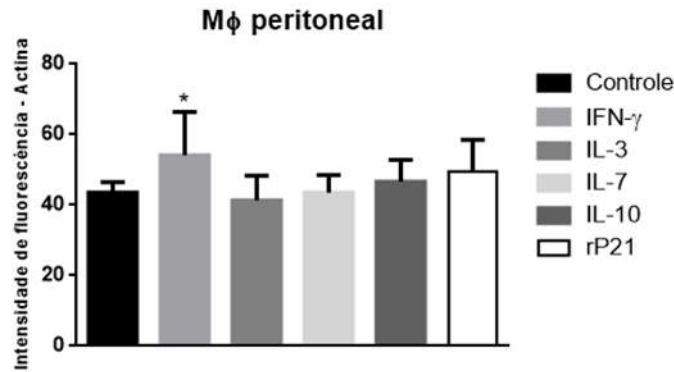
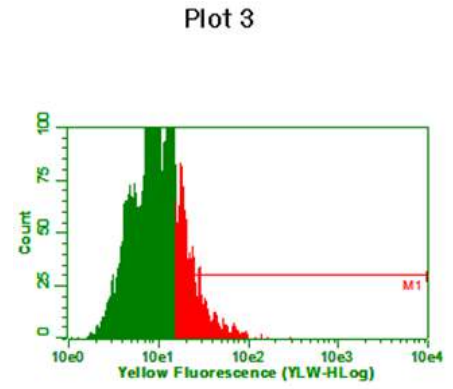
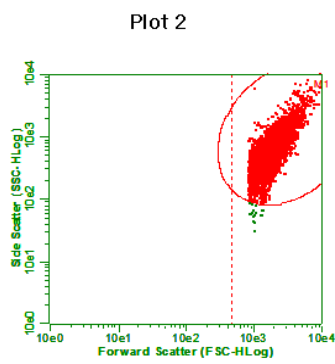
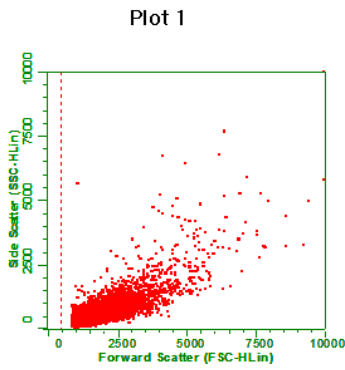
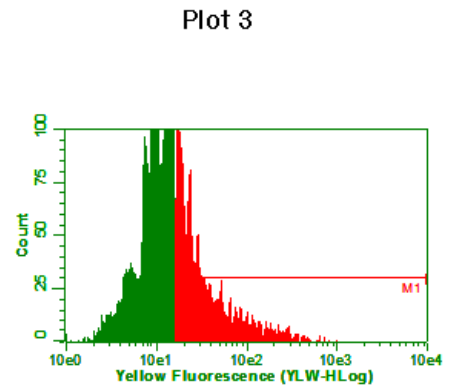
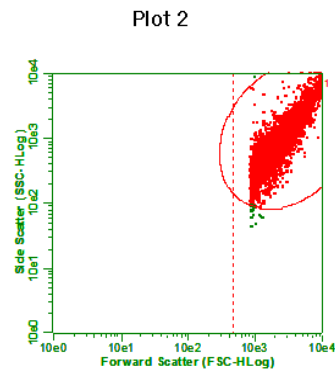
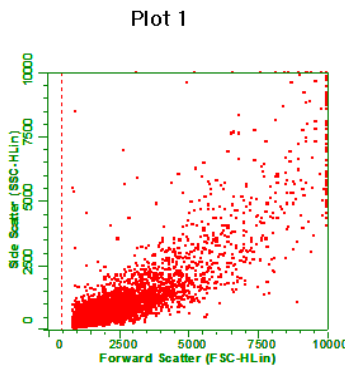
E – IL-10**F – rP21****G**

Figura 5. Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina de macrófagos peritoneais. (A) Macrófagos peritoneais sem tratamento. (B) Macrófagos tratados com IFN- γ na concentração de 10 ng/mL. (C) Macrófagos tratados com IL-3 na concentração de 10 ng/mL. (D) Macrófagos tratados com IL-7 na concentração de 10 ng/mL. (E) Macrófagos tratados com IL-10 na concentração de 10 ng/mL. (F) Macrófagos tratados com rP21 na concentração de 40 μ g/mL. (G) Intensidade de fluorescência emitida pela polimerização de actina em relação aos diferentes tratamentos. *p < 0,05.

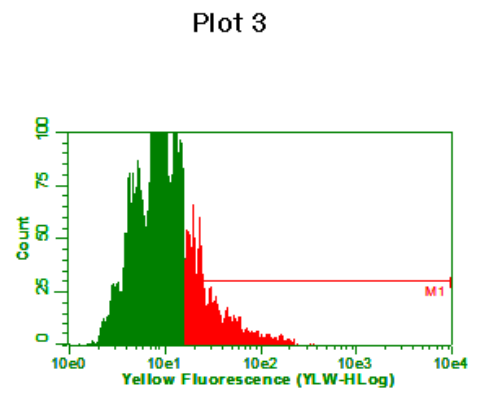
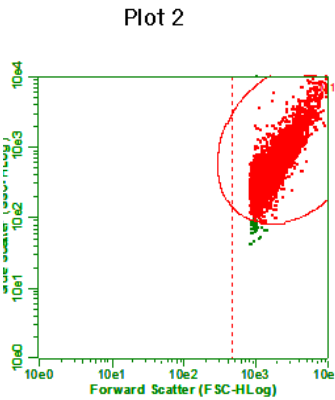
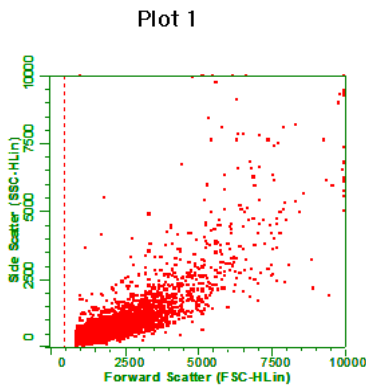
A- CONTROLE



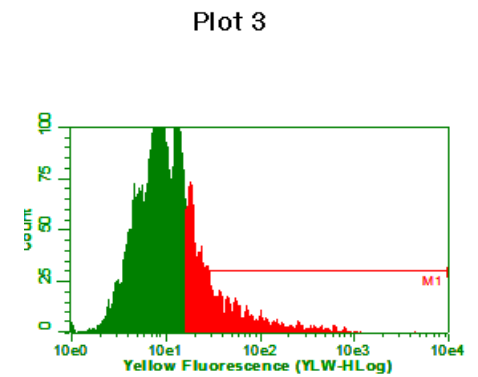
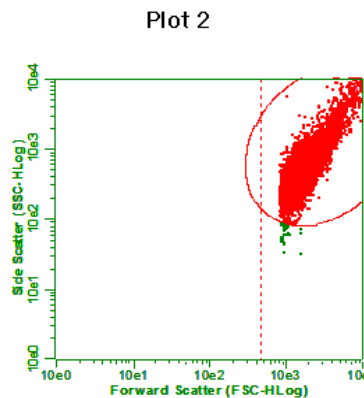
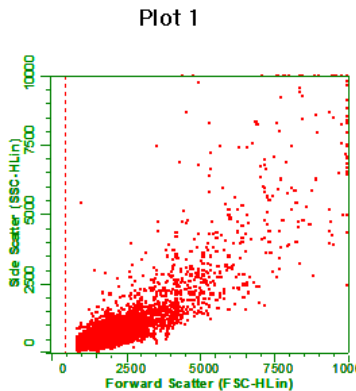
B - IFN- γ



C- IL-3



D - IL-7



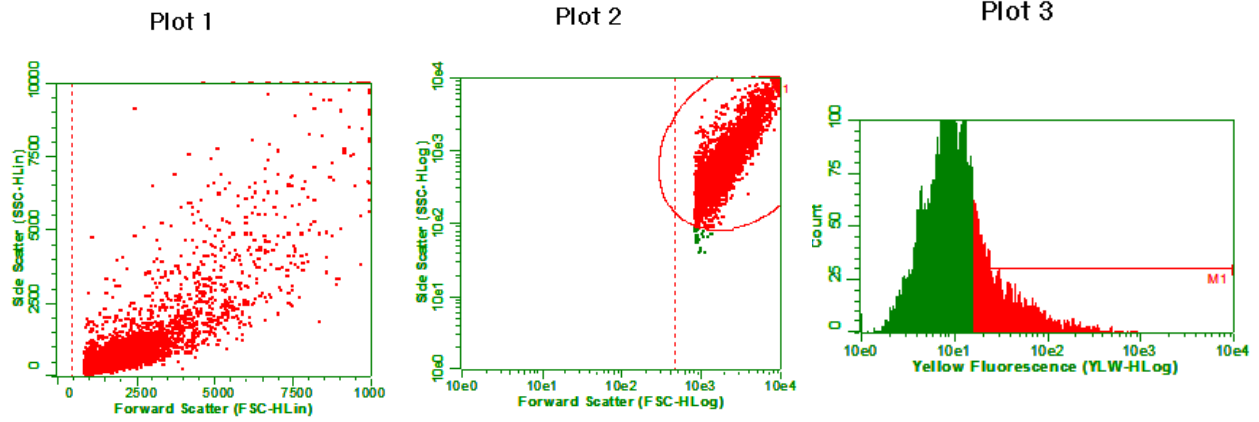
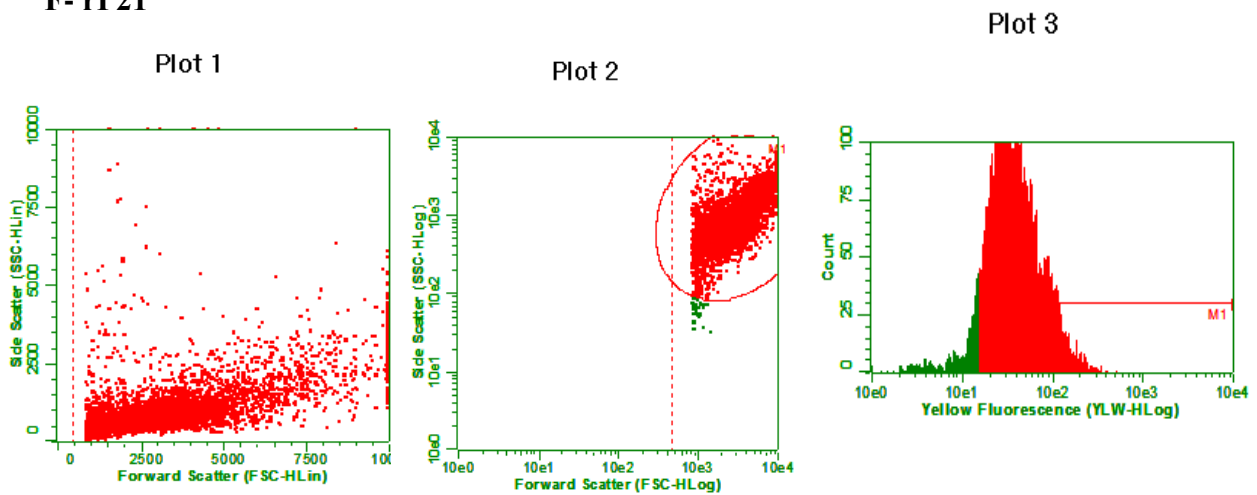
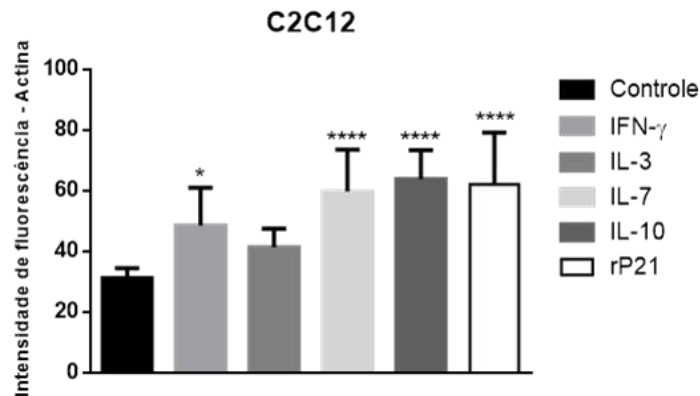
E – IL-10**F- rP21****G**

Figura 6. Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina de mioblastos C2C12. (A) Mioblastos C2C12 sem tratamento. (B) Mioblastos C2C12 tratados com IFN- γ na concentração de 10 ng/mL. (C) Mioblastos C2C12 tratados com IL-3 na concentração de 10 ng/mL. (D) Mioblastos C2C12 tratados com IL-7 na concentração de 10 ng/mL. (E) Mioblastos C2C12 tratados com IL-10 na concentração de 10 ng/mL. (F) Mioblastos C2C12 tratados com rP21 na concentração de 40 μ g/mL. (G) Intensidade de fluorescência emitida pela polimerização de actina em relação aos diferentes tratamentos. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

5.5 Análise do papel das citocinas IL-3, IL-7, IL-10, IFN- γ e da proteína da rP21 de *T. cruzi* na multiplicação parasitária

A multiplicação parasitária foi avaliada em macrófagos peritoneais inflamatórios obtidos a partir de camundongos C57BL/6 e em mioblastos C2C12. Tais células foram plaqueadas em placas de 24 poços e no outro dia, infectadas por formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) das cepas G e Y de *T. cruzi*. Após 3 horas, os poços foram lavados três vezes com PBS e foi reposto o meio de cultura contendo ou não as citocinas IL-3, IL-7, IL-10 e IFN- γ na concentração de 10 ng/mL ou contendo a proteína rP21 na concentração de 40 μ g/mL. No caso do tratamento com a rP21, o meio presente nos poços foi substituído diariamente por novo meio contendo tal proteína na concentração supracitada. Além disso, o tratamento com a rP21 ocorreu de duas maneiras diferentes, na primeira, o meio contendo a rP21 foi adicionado logo após o período de infecção, e na segunda, a rP21 foi adicionada 24 horas pós-infecção (rP21 24h).

A fim de padronizar as concentrações das diferentes citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 que seriam utilizadas nos experimentos de multiplicação, juntamente com o tempo de tratamento, macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 24 poços, e no outro dia infectados por 3 horas com *T. cruzi* da cepa G. Após este período, os poços foram lavados com PBS 1x, e então incubados com meio de cultura contendo diferentes tratamentos, por 72, 96 e 120 horas. As citocinas foram utilizadas nas concentrações de 10, 40 e 100 ng/mL, com exceção do IFN- γ , devido a toxicidade presente no tratamento com a concentração de 100 ng/mL. Todos os tratamentos foram eficazes em diminuir a multiplicação parasitária, nos diferentes tempos (figura 7). Não houve diminuição da multiplicação de maneira dose-dependente da concentração das citocinas, figura 7 (A-E), sendo que resultado semelhante foi observado em todos os tempos analisados.

Deste modo, optou-se por escolher a menor concentração utilizada (10 ng/mL) e o tempo intermediário de multiplicação, 96 horas. Os demais ensaios de multiplicação foram realizados utilizando as citocinas na concentração de 10 ng/mL e a rP21 a 40 μ g/mL, sendo o tempo de multiplicação de 96 horas.

Devido ao fato de que não havia 100 células em todas as situações utilizadas no experimento de multiplicação. Assim, optamos por utilizar o cálculo alternativo de: porcentagem

(%) de células infectadas, número médio de parasitas por células e total de parasitas encontrados nas células infectadas.

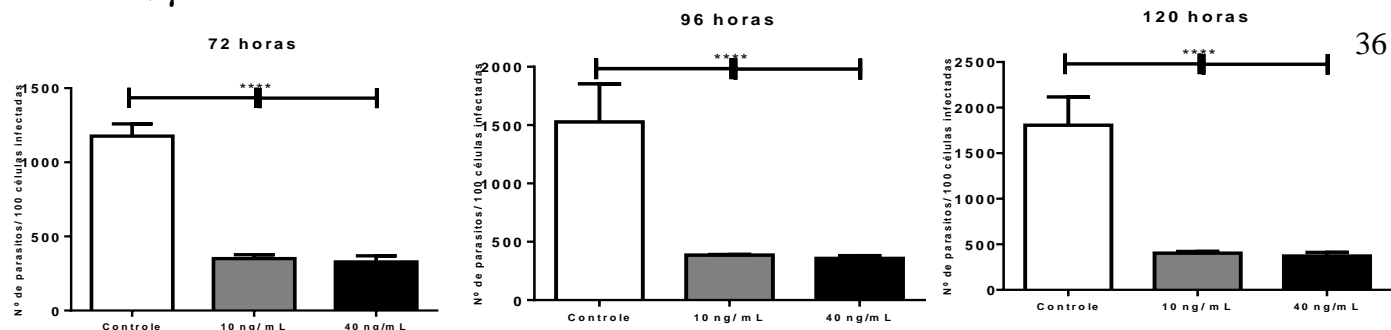
Então, foi realizada a análise na forma mencionada acima de macrófagos peritoneais infectados com TCT G (figura 8). Observou-se que os tratamentos com IFN- γ , IL-3 e rP21 24h, reduziram significativamente a porcentagem de células infectadas (figura 8-H). Em relação ao número médio de parasitas intracelulares, nenhum dos grupos tratados mostrou diferença significativa em relação ao controle (figura 8 – I). Enquanto isso, o número total de parasitas estava reduzido nos tratamentos com IFN- γ , IL-3, rP21 e rP21 24h (figura 8 – J).

Ao se infectar macrófagos peritoneais com TCT Y, da mesma forma descrita anteriormente, os tratamentos com IFN- γ , IL-3, IL-7, rP21 e rP21 24h, diminuíram significativamente a porcentagem de células infectadas, quando comparados ao controle (figura 9-H). Em relação ao número médio de parasitas intracelulares, houve redução significativa quando as células foram tratadas com IFN- γ , IL-3, IL-7 e rP21 (figura 9-I). De forma similar, o número total de parasitas estava diminuído, quando se tratou com IFN- γ , IL-3, IL-7, rP21 e rP21 24h (figura 9-J).

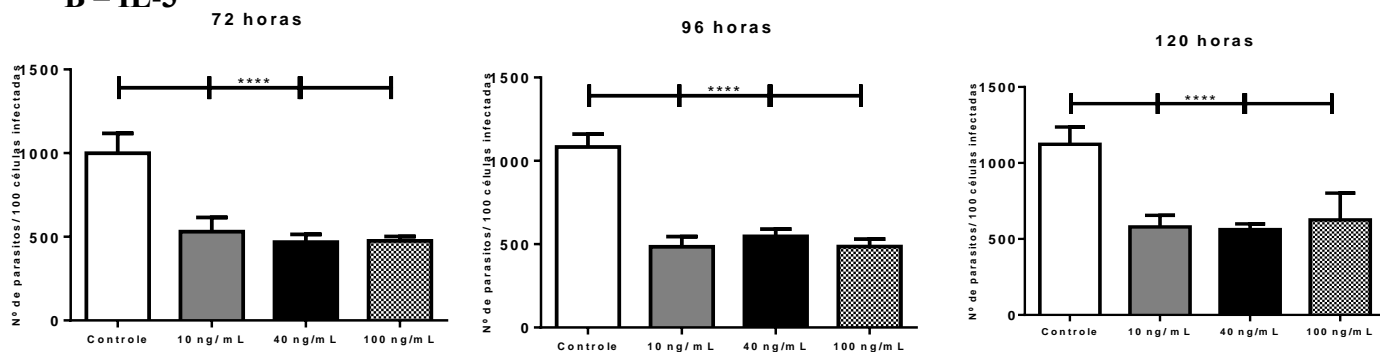
Para analisar se as diferentes citocinas possuíam efeito na multiplicação parasitária em mioblastos C2C12, infectamos as células com TCT G e TCT Y, conforme descrito anteriormente. Quando os mioblastos C2C12 foram infectadas com a cepa G, os tratamentos com IFN- γ , IL-7 e rP21 reduziram significativamente a porcentagem de células infectadas (figura 10 - H). Em relação ao número médio de parasitas por célula, apenas os tratamentos com IFN- γ e IL-10 foram capazes de diminuir a taxa de parasitas por células, quando comparado ao controle (figura 10-I). Ao se analisar o efeito dos diferentes tratamentos sob o número total de parasitas, os tratamentos com IFN- γ , IL-7, IL-10, rP21 e rP21 24h, induziram redução significativa (figura 10-J).

Nos mioblastos infectados com TCT Y (figura 11), os tratamentos com IFN- γ , IL-3, IL-10 e rP21 diminuíram a porcentagem de células infectadas (figura 11-H). Enquanto isso, os tratamentos com IFN- γ , IL-10 e rP21, diminuíram o número médio de parasitas por célula (figura 11-I), e os tratamentos com IFN- γ , IL-3, IL-10, rP21 e rP21 24h, reduziram o número total de parasitas encontrados (figura 11-J).

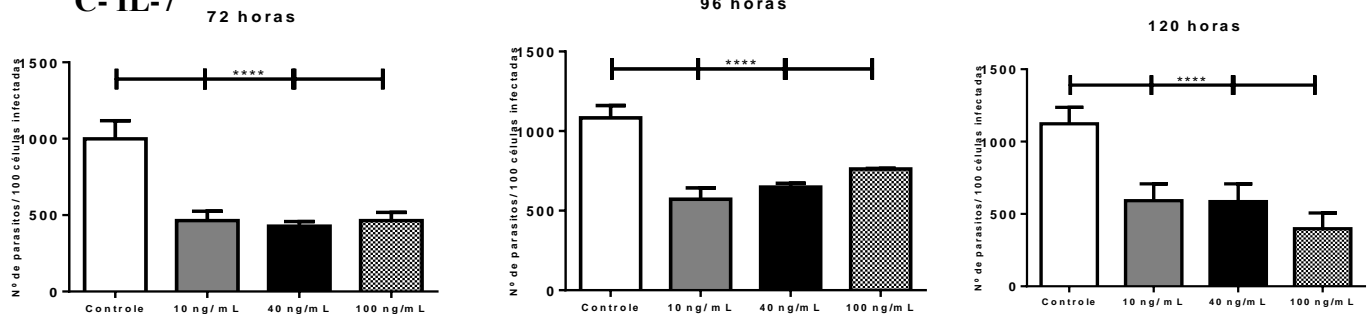
A - IFN- γ



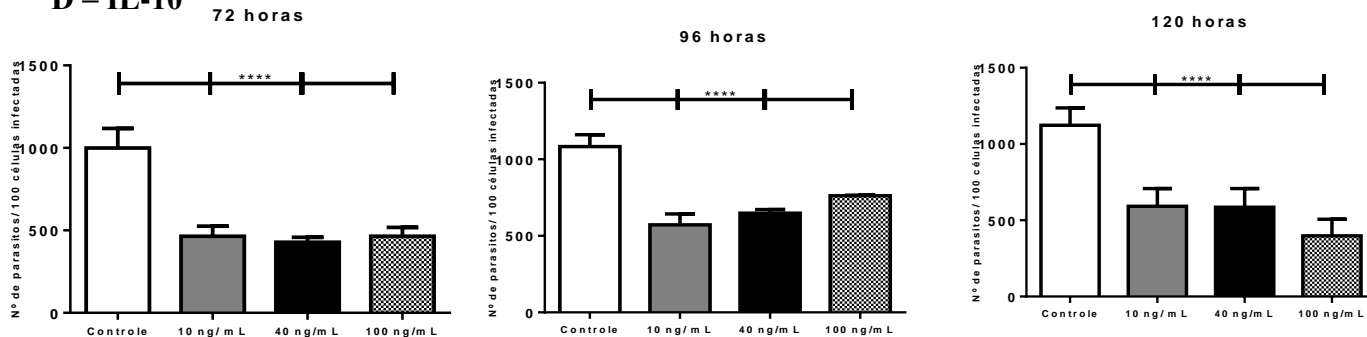
B - IL-3



C - IL-7



D - IL-10



E - rP21

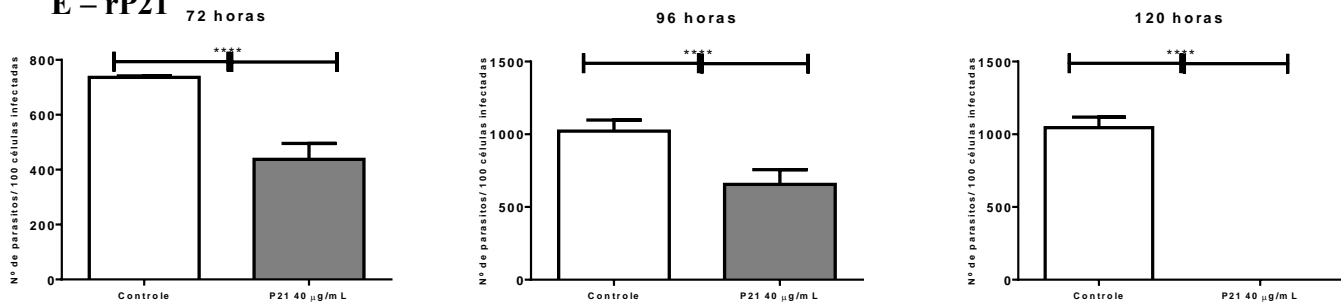
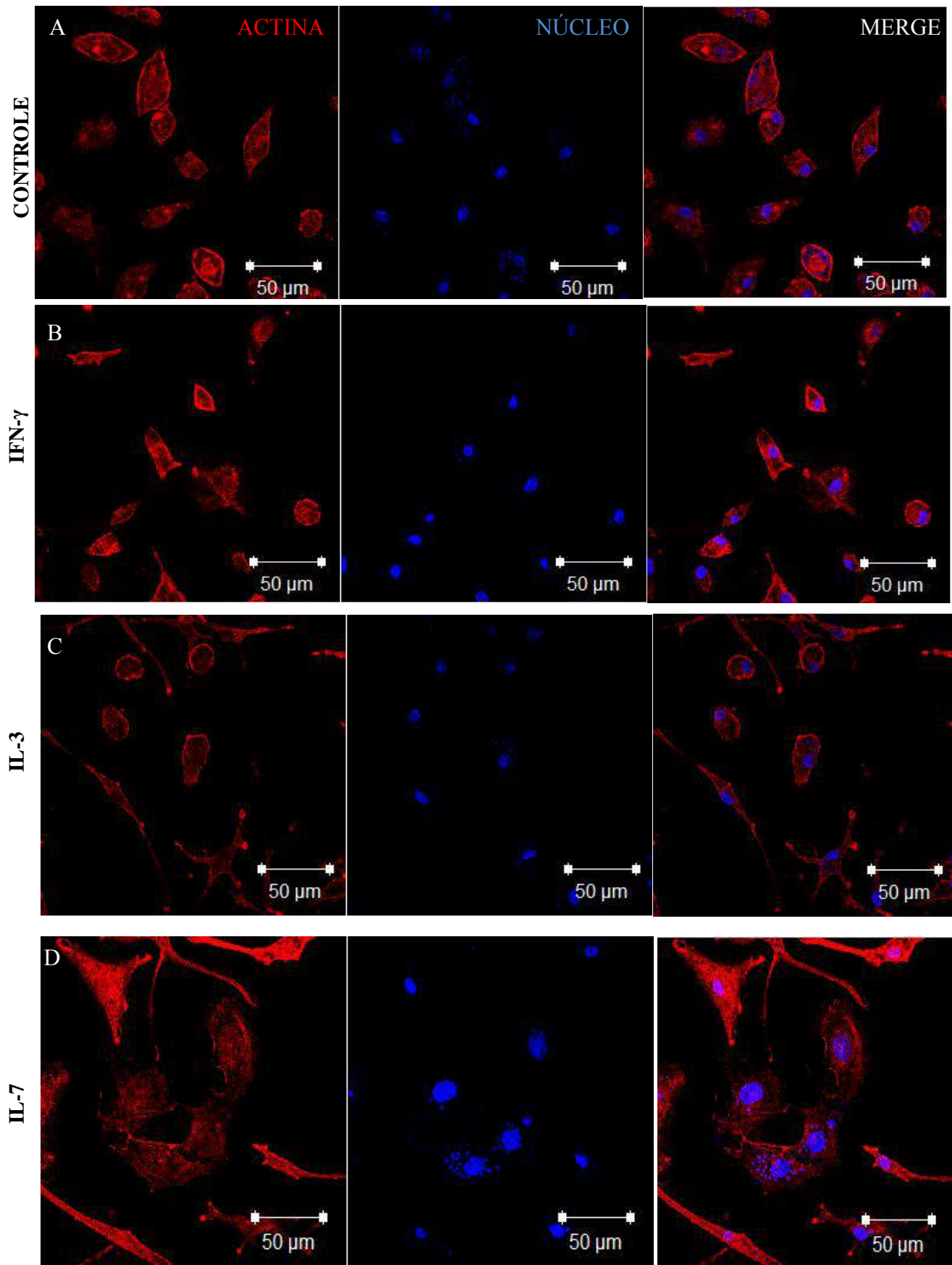
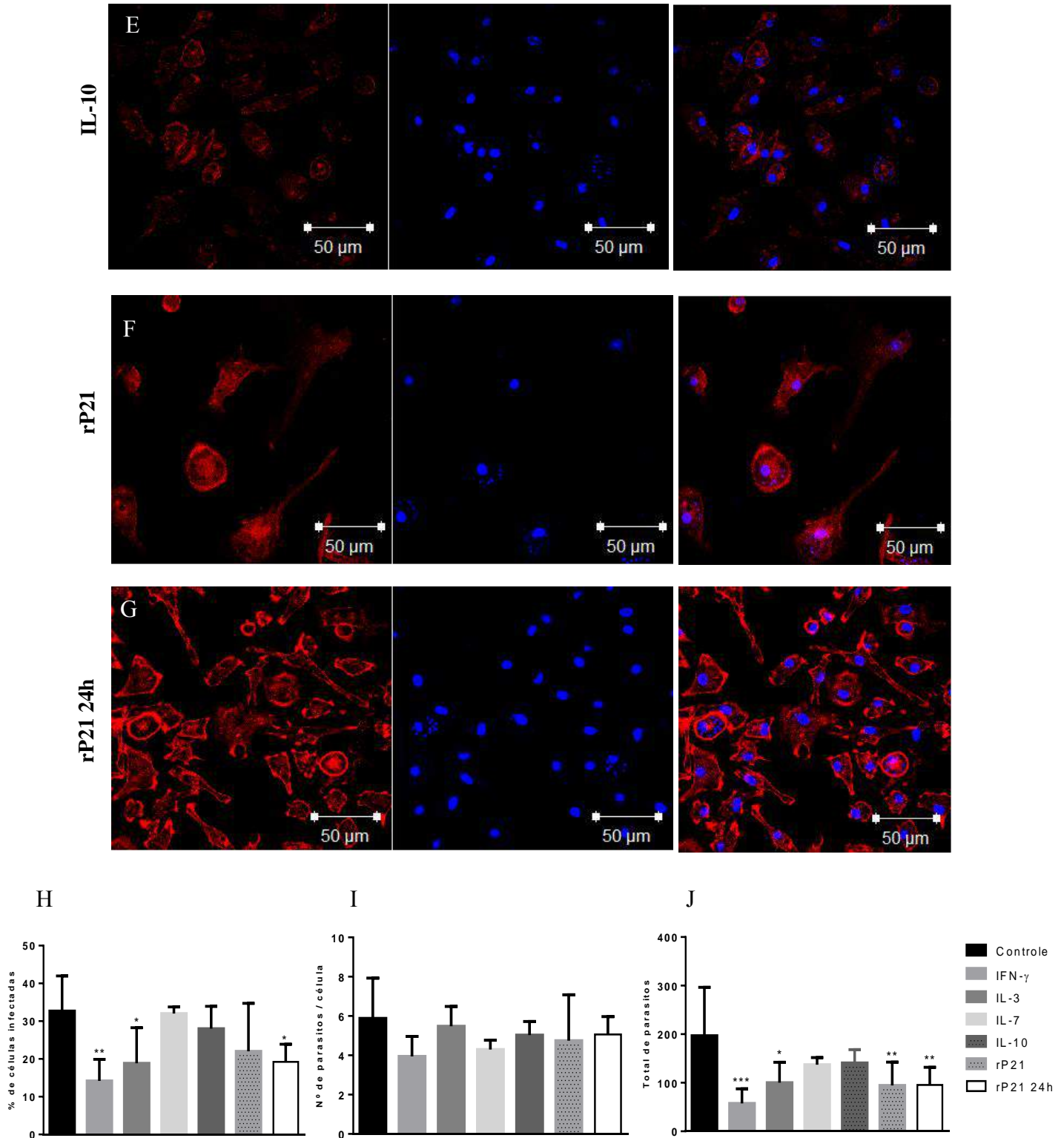
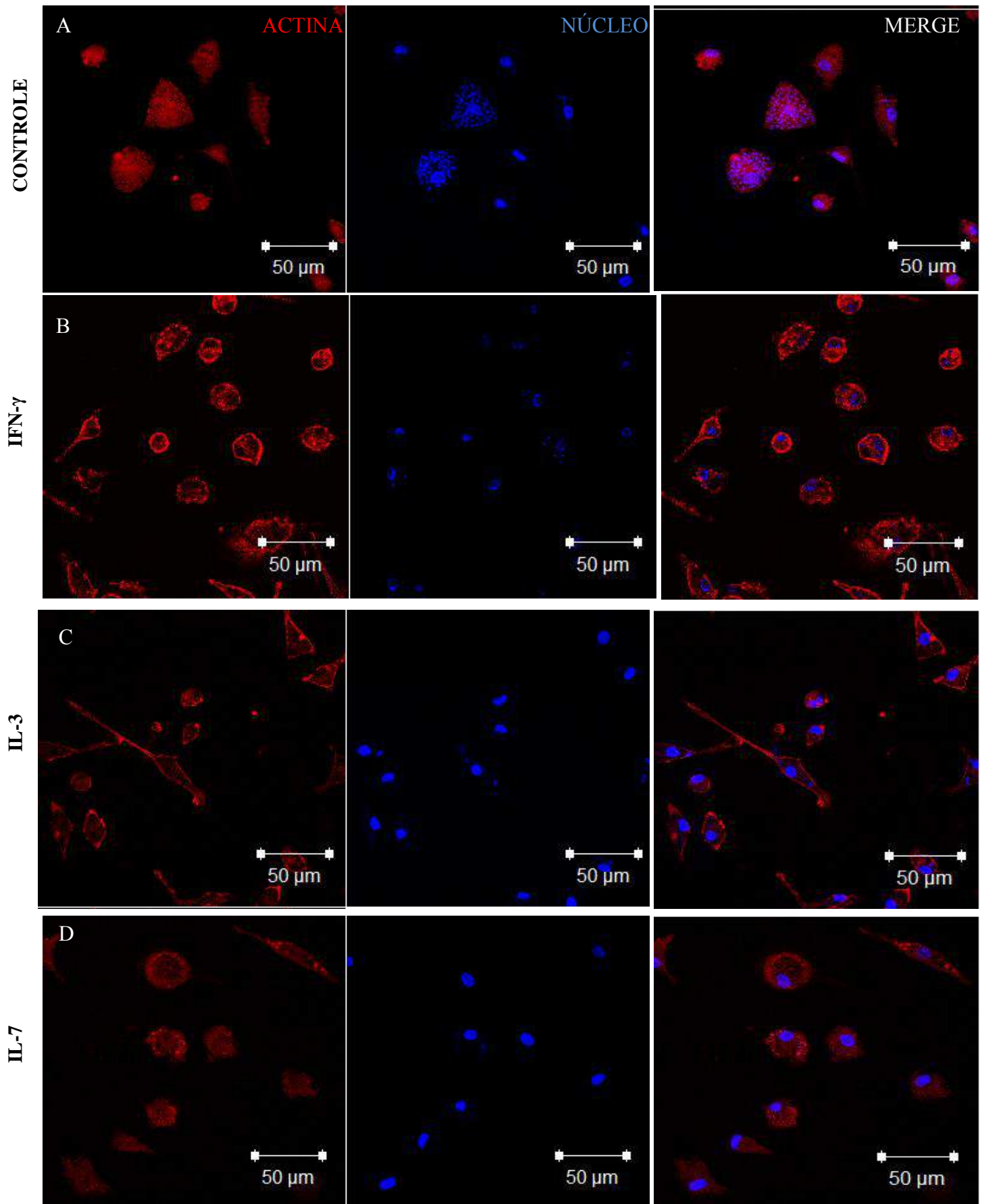


Figura 7. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária da cepa G de *T. cruzi* (TCTG) em macrófagos peritoneais. (A) Tratamento de macrófagos peritoneais infectados com IFN - γ em nas concentrações de 10 e 40 ng/mL, tempos de 72, 96 e 120 horas. (B) Macrófagos infectados com TCTG e tratados com IL-3 nas concentrações de 10, 40 e 100 ng/mL, tempos de 72, 96 e 120 horas. (C) Macrófagos infectados com TCTG e tratados com IL-7 nas concentrações de 10, 40 e 100 ng/mL, tempos de 72, 96 e 120 horas. (D) Macrófagos infectados com TCTG e tratados com IL-10 nas concentrações de 10, 40 e 100 ng/mL, tempos de 72, 96 e 120 horas. (E) Macrófagos infectados com TCTG e tratados com a proteína rP21 na concentração 40 µg/mL, tempos de 72, 96 e 120 horas.

MΦ peritoneal + TCTG



MΦ peritoneal + TCT Y

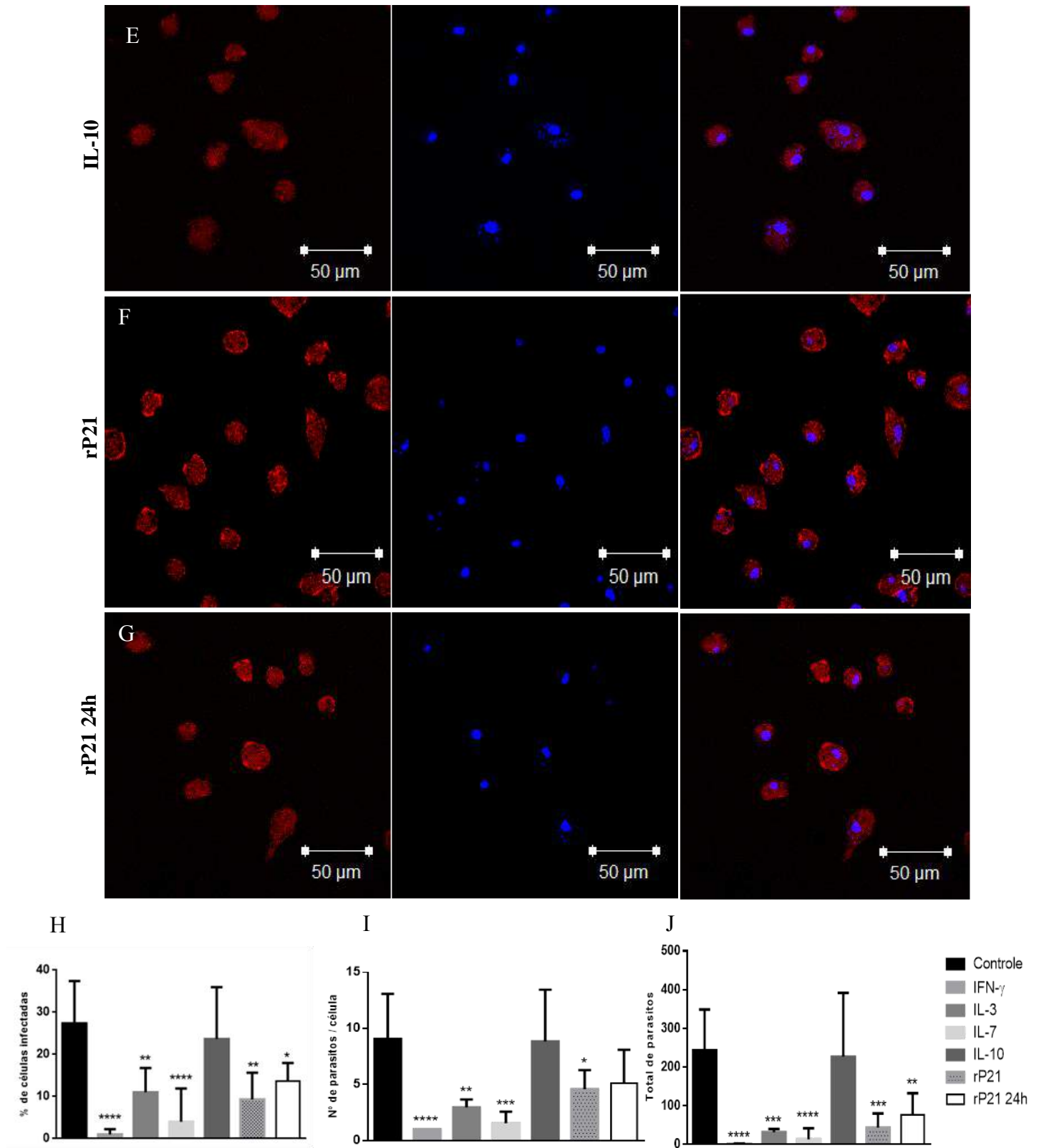
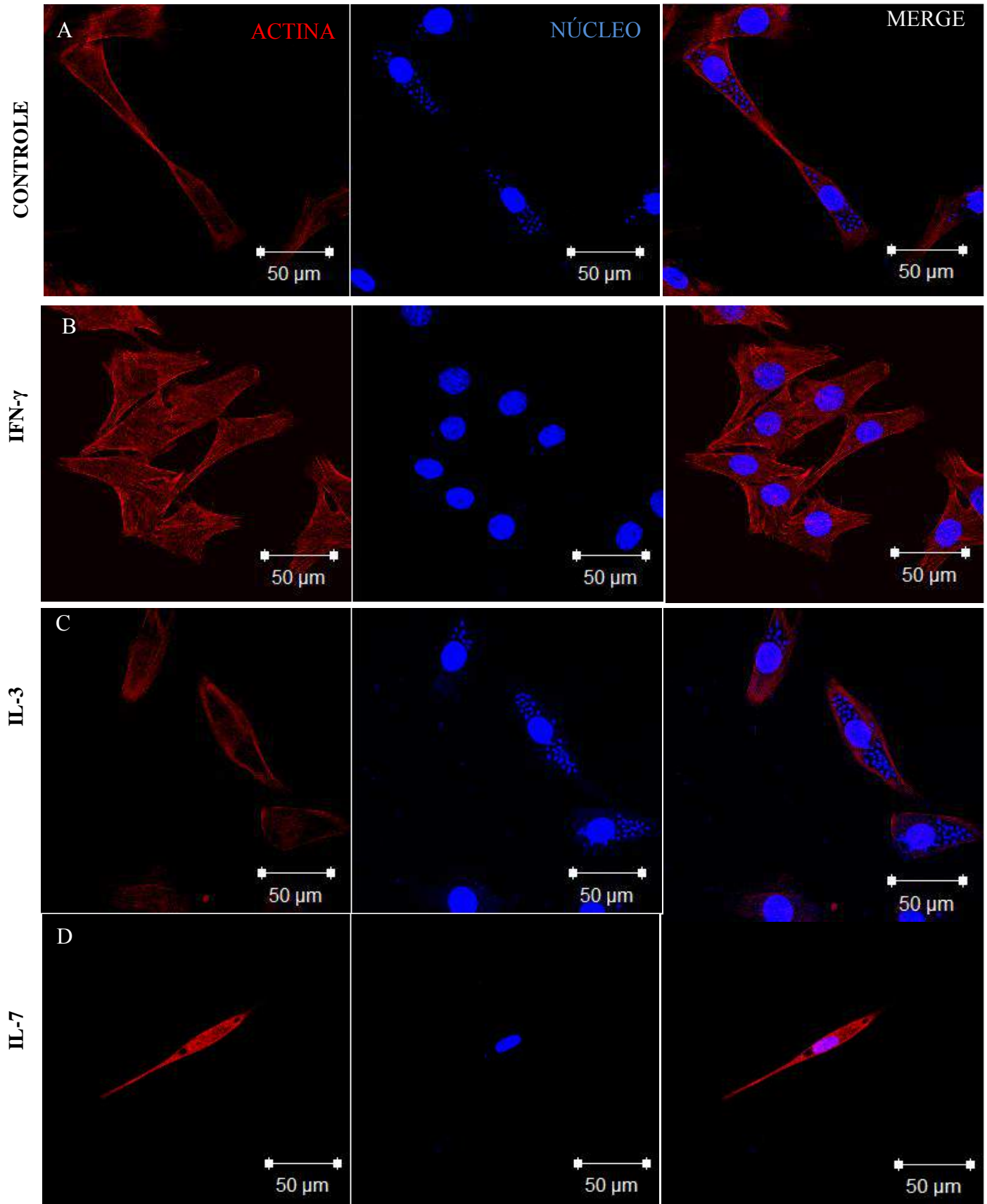


Figura 9. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, macrófago peritoneal infectado com cepa Y de *T. cruzi*, 96 horas. (A) Controle. (B) Macrófagos tratados com IFN- γ (10 ng/mL). (C) Macrófagos tratados com IL-3 (10 ng/mL). (D) Macrófagos tratados com IL-7 (10 ng/mL). (E) Macrófagos tratados com IL-10 (10 ng/mL). (F) Macrófagos tratados com rP21 (40 μ g/mL). (G) Macrófagos tratados com rP21 (40 μ g/mL) 24 horas pós-infecção. (H) Porcentagem de células infectadas. (I) Número de parasitos por células. (J) Total de parasitos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

C2C12 + TCT G



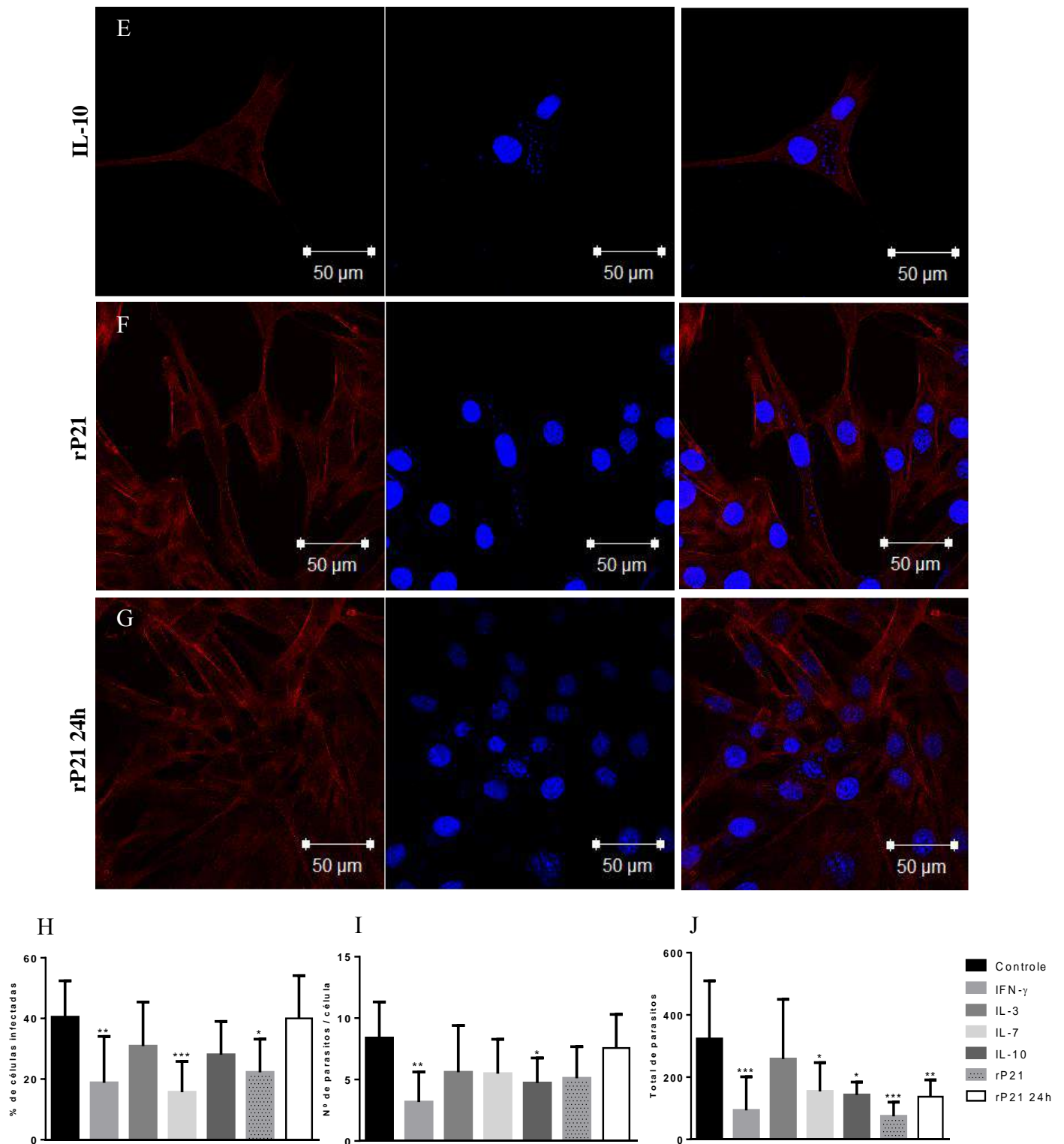
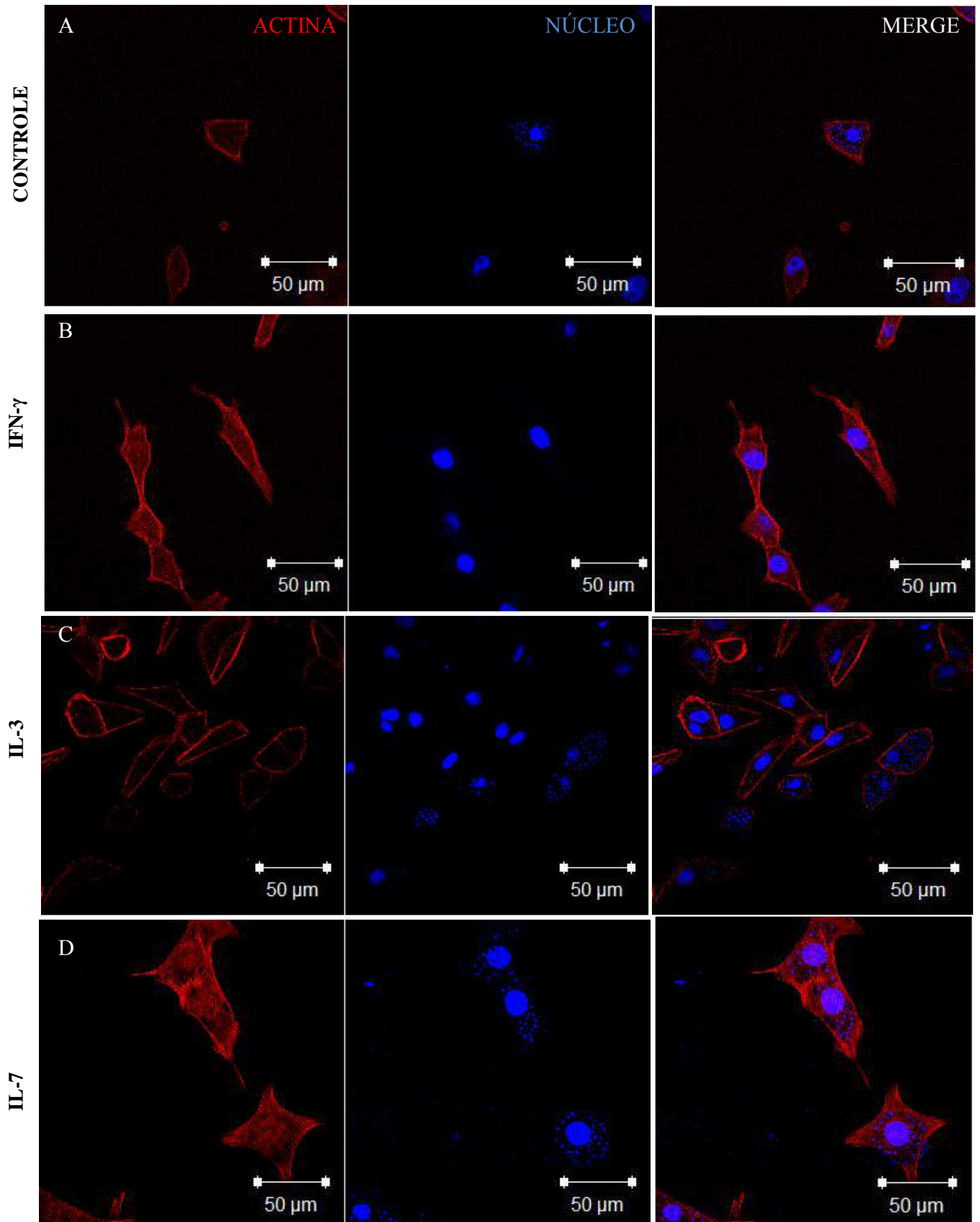


Figura 10. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, mioblastos C2C12 infectados com cepa G de *T. cruzi*, 96 horas. (A) Controle. (B) Mioblastos tratados com IFN- γ (10 ng/mL). (C) Mioblastos tratados com IL-3 (10 ng/mL). (D) Mioblastos tratados com IL-7 (10 ng/mL). (E) Mioblastos tratados com IL-10 (10 ng/mL). (F) Mioblastos tratados com rP21 (40 μ g/mL). (G) Mioblastos tratados com rP21 (40 μ g/mL) 24 horas pós-infecção. (H) Porcentagem de células infectadas. (I) Número de parasitos por células. (J) Total de parasitos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.**

C2C12 + TCT Y



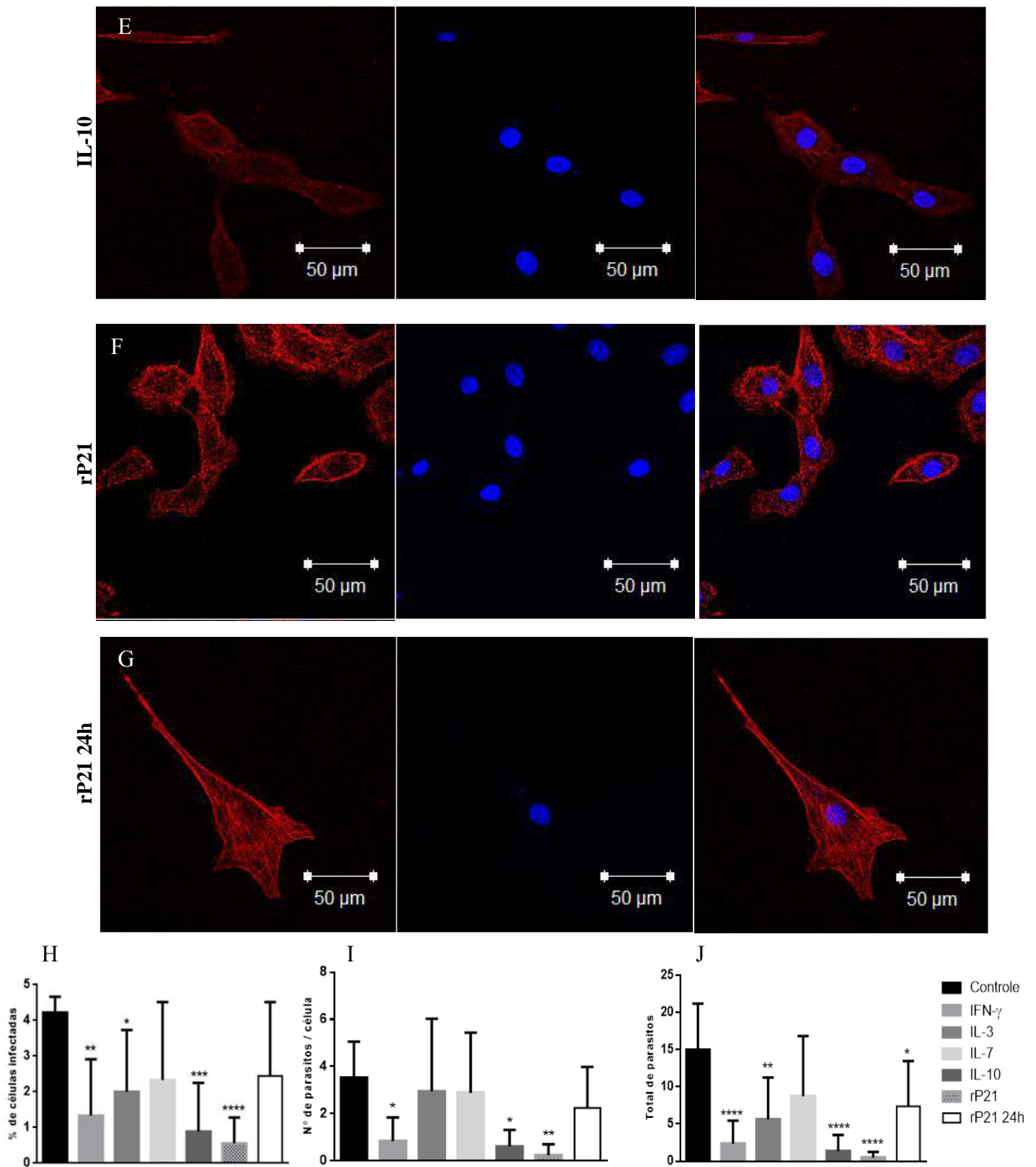


Figura 11. Análise do papel das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 na multiplicação parasitária, mioblastos C2C12 infectados com cepa Y de *T. cruzi*, 96 horas. (A) Controle. (B) Mioblastos tratados com IFN- γ (10 ng/mL). (C) Mioblastos tratados com IL-3 (10 ng/mL). (D) Mioblastos tratados com IL-7 (10 ng/mL). (E) Mioblastos tratados com IL-10 (10 ng/mL). (F) Mioblastos tratados com rP21 (40 μ g/mL). (G) Mioblastos tratados com rP21 (40 μ g/mL) 24 horas pós-infecção. (H) Porcentagem de células infectadas. (I) Número de parasitos por células. (J) Total de parasitos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.**

5.6 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (1982), que consiste na detecção de nitrito (NO_2^-), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Assim, foi realizada análise do efeito dos tratamentos em relação à produção de óxido nítrico. Para isto, foram coletados sobrenadantes das células nas seguintes condições: macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 tratados com as citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 (96 horas) e a proteína rP21 (meio resposto a cada 24 horas); macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 infectados com TCT G e submetidos aos diferentes tratamentos; macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 infectados com TCT Y e submetidos aos diferentes tratamentos.

Como podemos observar na figura 12, o tratamento de macrófagos peritoneais com IFN- γ induziu aumento significativo na concentração de nitrito ($\mu\text{M/L}$), enquanto o tratamento com IL-3, IL-7, IL-10 e rP21 diminuiu esta concentração (figura 12-A). No caso dos diferentes tratamentos em mioblastos C2C12, nenhum grupo apresentou diferença significativa, quando comparados ao controle (figura 12-B).

O sobrenadante de macrófago peritoneal infectado com TCT G, apresentou aumento da concentração de nitrito, apenas quando as células foram submetidas ao tratamento com IFN- γ (figura 12-C). Tal resultado foi diferente do encontrado no sobrenadante de C2C12 infectado com TCT G, onde apenas o tratamento com a proteína rP21, aumentou significativamente a produção de nitrito (figura 12-D).

Ao se analisar o sobrenadante de macrófagos peritoneais infectados com TCT Y, foi observado que os tratamentos com IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10, aumentaram significativamente a produção de nitrito, quando comparados ao controle (figura 12-E). Diferentemente, o sobrenadante de mioblastos C2C12 infectados com TCT Y, apresentou aumento na concentração de nitrito apenas quando as células foram submetidas ao tratamento com rP21 e rP21 24h (figura 12-F).

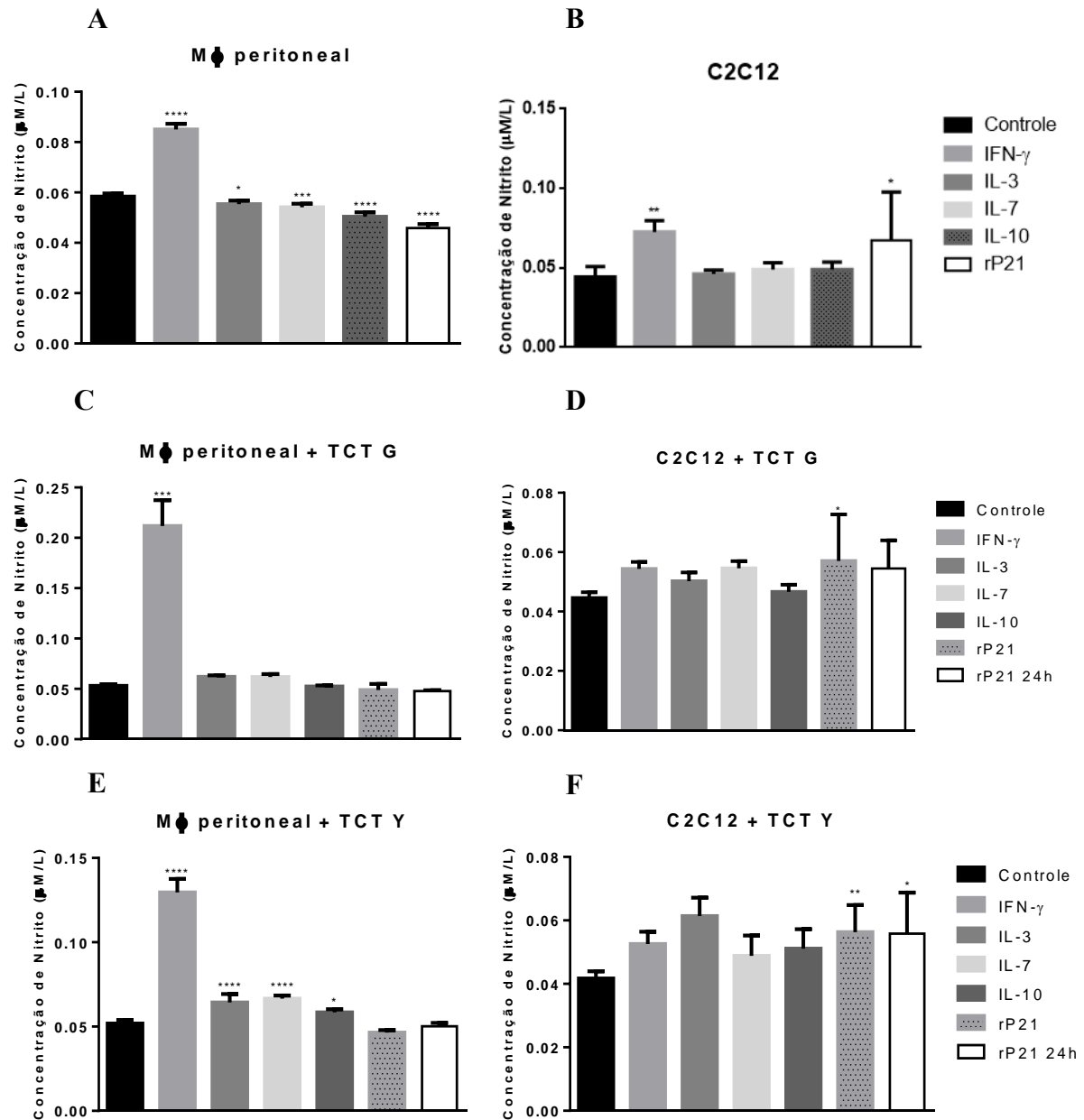


Figura 12. Dosagem de óxido nítrico (NO). Dosagem de NO de sobrenadante de células tratadas com as diferentes citocinas e a proteína rP21. (A) Macrófago peritoneal. (B) Mioblastos C2C12. (C) Dosagem de NO do sobrenadante de macrófagos peritoneais infectados com TCT G. (D) Dosagem de NO do sobrenadante de mioblastos C2C12 infectados com TCT G. (E) Dosagem de NO do sobrenadante de macrófagos peritoneais infectados com TCT Y. (F) Dosagem de NO do sobrenadante de mioblastos C2C12 infectados com TCT Y. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.7 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para determinação da interferência dos diferentes tratamentos em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12 foram infectados ou não, seguido de incubação por 96 horas com as citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10 e a proteína rP21. Após o período de incubação, foi adicionado meio de cultura contendo ou não a sonda DCFH-DA a 1-2 μ M. Os macrófagos peritoneais tratados com IFN- γ , apresentaram aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (figura 13-A). Já no caso de mioblastos C2C12, a produção de ROS estava aumentada significativamente, quando as células foram tratadas com IFN- γ e a proteína rP21 (figura 13-B).

Macrófagos peritoneais infectados com TCT G, tiveram a produção de ROS aumentada significativamente quando tratados com IFN- γ , porém a produção de ROS foi diminuída quando se tratou com as citocinas IL-10 e a proteína rP21 24 h (figura 13-C). As células C2C12 submetidas a infecção com TCT G, não apresentou alteração da produção de espécies reativas de oxigênio quando tratadas sob as diferentes condições (figura 13-D).

Ao se analisar a produção de ROS por macrófagos infectados com a cepa Y, o tratamento com IL-10 e rP21 24h, diminuiu significativamente a produção quando comparado ao controle (figura 13-E). Já as células C2C12 infectadas com TCT Y, apresentaram diminuição da produção de ROS, quando tratadas com a proteína rP21 24h (figura 13-F).

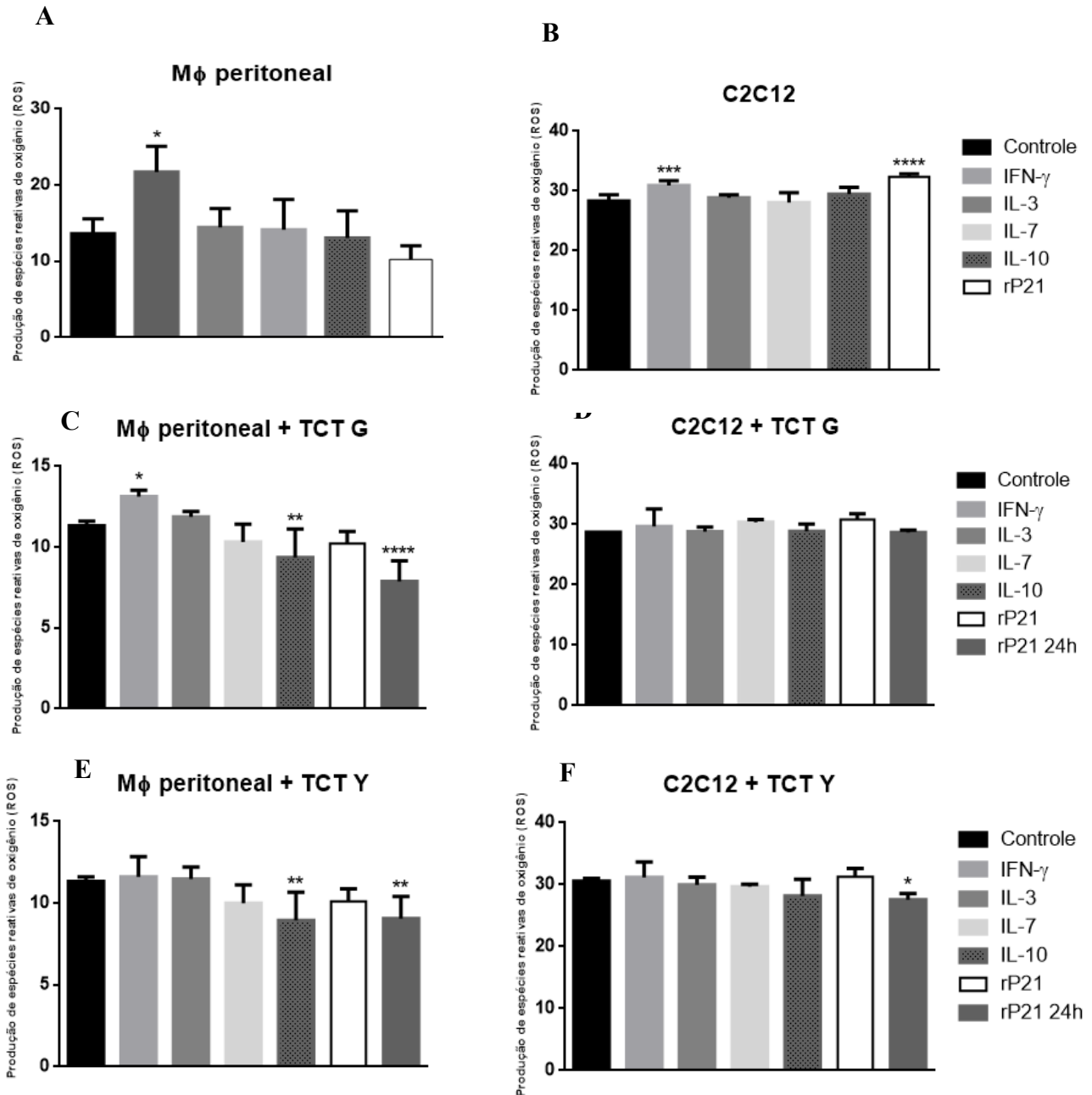


Figura 13. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células infectadas ou não e tratadas com as diferentes citocinas e a proteína rP21. (A) Macrófago peritoneal tratado com as diferentes citocinas e a rP21. (B) Mioblastos C2C12 tratados com as diferentes citocinas e a rP21. (C) Produção de ROS em macrófagos peritoneais infectados com TCT G. (D) Produção de ROS em mioblastos C2C12 infectados com TCT G. (E) Produção de ROS em macrófagos peritoneais infectados com TCT Y. (F) Produção de ROS em mioblastos C2C12 infectados com TCT Y. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6. Discussão

6.1 Polimerização do citoesqueleto de actina

Os papéis das citocinas IFN- γ e IL-10 na infecção por *T. cruzi*, têm sido amplamente estudados por vários grupos de pesquisa (FRAUSTO-DEL-RÍO et al., 2012). Enquanto isso, as citocinas IL-3 e IL-7 foram relacionadas na infecção por *T. cruzi*, apenas recentemente por Rodrigues (2015), onde IL-3 se apresentou altamente expressa durante a infecção crônica experimental em camundongos e a citocina IL-7, aumentada na infecção experimental aguda e crônica causada pela cepa CL (RODRIGUES, 2015). Neste trabalho, foram analisados os efeitos das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 sob a polimerização do citoesqueleto de actina e na multiplicação parasitária de duas cepas de *T. cruzi*, G e Y, as quais apresentam características diferentes.

Com a finalidade de escolher a melhor concentração das citocinas a ser utilizada, foi realizado experimentos de padronização, utilizando macrófagos peritoneais (derivados de camundongos C57BL/6) e formas tripomastigotas da cepa G. Com base nos resultados obtidos (figura 7), padronizou-se para utilização nos demais experimentos, a menor concentração utilizada das diferentes citocinas (10 ng/mL), uma vez que o efeito destas sob a multiplicação parasitária não ocorreu de maneira dose-dependente. O tempo de análise que foi escolhido para utilização neste estudo, foi o de 96 horas, uma vez que apresentou padrão similar na taxa de multiplicação, quando comparado aos demais grupos (figura 7-E).

A análise da polimerização de actina, utilizando o kit *Actin Polymerization Biochem* mostrou que as citocinas IFN- γ e IL-7 foram capazes de aumentar a polimerização dos monômeros de G-actina em filamentos de actina (Figura 2). Neste experimento, não foi utilizada a proteína rP21, uma vez que o trabalho realizado por Borges (2015) mostrou a habilidade da mesma em polimerizar os monômeros de G-actina. Este experimento avaliou a capacidade das citocinas polimerizarem diretamente os monômeros de actina, dispensando qualquer sinalização intracelular.

Assim, realizou-se experimentos para avaliar a capacidade de indução de polimerização do citoesqueleto de actina em modelos celulares (macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12). A

análise por microscopia confocal de macrófagos peritoneais, mostrou que a citocina IFN- γ e a proteína rP21 (figura 3) aumentaram a polimerização de actina, quando comparado ao controle. A citometria de fluxo mostrou resultado semelhante (figura 5).

Ao se analisar os efeitos das citocinas na polimerização de actina em mioblastos C2C12, foi observado, por microscopia confocal, que as citocinas IFN- γ , IL-7 e a proteína rP21, induziram um aumento significativo na polimerização do citoesqueleto de actina (figura 4). Tal resultado foi confirmado por análise em citômetro de fluxo, com exceção da citocina IL-10 que, diferentemente do que fora observado na microscopia confocal, induziu aumento na polimerização do citoesqueleto de actina em células C2C12.

O efeito na indução da polimerização de actina promovido pela citocina IFN- γ , já foi relatado anteriormente por Frausto-Del-Río e colaboradores (2012) onde esta citocina aumentou a polimerização de actina quando utilizada na concentração de 300 ng/mL. Obtivemos resultados similares, utilizando a concentração de 10 ng/mL. Esta habilidade em aumentar a polimerização de actina, pode ser devido à ativação de Rac1 por IFN- γ , a qual resulta em altos níveis de filamentos de actina (F- actina) (FRAUSTO-DEL-RÍO et al., 2012).

A habilidade de IL-7 induzir um aumento na polimerização de actina não havia sido relatado anteriormente, além disso, estudos relacionando esta citocina com a infecção por *T. cruzi* são bem escassos (RODRIGUES, 2015). Porém, o fato desta citocina estar sendo altamente expressa na infecção experimental por *T. cruzi* (RODRIGUES, 2015), sugere que ela possa ter efeito na modulação na passagem para a fase crônica da doença, uma vez que polimerizando a actina, os parasitas estariam firmemente retidos no interior das células.

A citocina IL-10 mostrou induzir a polimerização de actina apenas na análise de citometria de fluxo em células C2C12 (figura 6). Tal efeito não ocorreu em macrófagos peritoneais, o que corrobora com a literatura (FRAUSTO-DEL-RÍO et al., 2012). Este resultado pode ser justificado pela falha na ativação de Rac1 e Cd42 (proteínas envolvidas na polimerização de actina) por IL-10 (FRAUSTO-DEL-RÍO et al., 2012). A diferença existente entre os resultados obtidos por microscopia confocal (figura 4) e citometria de fluxo (figura 6), pode ser devido à diferenças de sensibilidade entre os métodos, sendo necessário mais

experimentos para confirmar o papel de IL-10 na indução da polimerização de actina em células C2C12.

A proteína rP21 aumentou a polimerização de actina em macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12. Esta proteína, foi caracterizada por Silva et al. (2009) e sua forma recombinante pode ser facilmente obtida *in vitro*. A rP21 já havia sido associada anteriormente à capacidade de aumentar a polimerização de actina, em macrófagos peritoneais, quando incubados por 1 hora. Porém, até então esse efeito não havia sido observado em outras células, como em mioblastos C2C12. Essa atividade é dependente da ligação ao receptor de quimiocinas CXCR4, o qual induz polimerização do citoesqueleto de actina por meio da ativação da via envolvendo PI3-quinase (RODRIGUES et al., 2012b).

6.2 Citocinas, rP21 e a multiplicação parasitária

As diferentes manifestações clínicas apresentadas pela doença de Chagas têm sido relacionadas com a heterogeneidade entre as cepas de *T. cruzi*, seus mecanismos de evasão e às variações da resposta imune do hospedeiro (MAGALHÃES et al., 2015). Apesar da extensa literatura sobre resposta imune anti- *T. cruzi*, a maioria dos estudos publicados avaliaram apenas uma única cepa do parasita. Sabe-se, por exemplo, que cepas do grupo TcI e TcII causam diferentes comportamentos no sistema imune (MAGALHÃES et al., 2015).

As cepas de *T. cruzi* são classificadas em seis grupos denominados de DTU's, TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. Todos possuem características biológicas e geográficas diferentes. O grupo TcI é o mais abundante na América e pode ser associado com o ciclo doméstico e selvagem. O grupo TcII está mais associado com o ciclo doméstico na América do Sul (MAGALHÃES et al., 2015). A cepa Y (TcII) é capaz de induzir alta resposta imune durante a fase aguda da infecção (MAGALHÃES et al., 2015). A cepa G utilizada no estudo pertence à TcI, enquanto a cepa Y à TcII.

Sabe-se que as cepas de *T. cruzi* apresentam tropismos diferentes para diversos tecidos como descrito por vários trabalhos (VIANNA, 1911; CAMPOS, 1927, TALIAFERRO, PIZZI, 1955; BICE, ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1973; HANSON, ROBERSON, 1974; OLIVEIRA

et al., 2012). A localização preferencial de *T. cruzi* em certos tecidos ou órgãos como o pâncreas (WATKINS, 1966), bexiga (BICE, ZELEDON, 1970), tecido adiposo (SHOEMAKER et al., 1970), musculatura lisa, esquelética e cardíaca já foram reportadas (BICE, ZELEDON, 1970; TAY et al., 1973; HANSON, ROBERSON, 1974). Assim, acredita-se que parasitos de populações distintas de *T. cruzi* são hábeis para invadir órgãos seletivos e tecidos ou evitar sua internalização por tipos específicos celulares. Isso justifica o comportamento diferente nos dois tipos celulares utilizados neste estudo. Tais diferenças no tropismo podem estar relacionadas a distintas moléculas do parasito que interagem distintamente com a célula hospedeira. Sendo assim, provavelmente algumas cepas tem predileção por certo órgão por ser mais favorável a sua interação com determinada célula do que outra.

Analizamos posteriormente o efeito das citocinas IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-10 e da proteína rP21 (incubada logo após a infecção e 24 horas depois) sob a multiplicação parasitária das cepas G e Y de *T. cruzi*, em macrófagos peritoneais e mioblastos C2C12. Ao infectarmos macrófagos peritoneais por TCT G, vimos que a porcentagem de células infectadas, estava diminuída quando tratadas com IFN- γ , IL-3 e rP21. Além disso, o número total de parasitas encontrados nas células infectadas, estava reduzido nos tratamentos com IFN- γ , IL-3, rP21 e rP21 24h (figura 8). Já na infecção de macrófagos com a cepa Y, é possível observar uma diminuição na porcentagem de células infectadas, redução do número médio de parasitas por célula e redução do número total de parasitas nos tratamentos com IFN- γ , IL-3, IL-7, rP21 e rP21 24h (figura 9).

A diminuição da multiplicação parasitária devido aos tratamentos com IFN- γ , IL-7 rP21 e rP21 24 horas, pode ser parcialmente atribuído à sua capacidade em induzir a polimerização do citoesqueleto de actina. Esta hipótese é respaldada pelo fato de que à medida que o parasita se multiplica no interior da célula, há um afrouxamento do citoesqueleto de actina, culminando na despolimerização do mesmo, resultando em um citoplasma livre de barreiras físicas para a multiplicação parasitária (MOTT et al., 2009).

Células C2C12 infectadas com TCT Y, submetidas ao tratamento com IFN- γ , IL-3, IL-10 e rP21, apresentaram diminuição da porcentagem de células infectadas, enquanto que, apenas nos grupos tratados com IFN- γ , IL-10 e rP21, houve redução do número médio de parasitas por célula. O número total de parasitas esteve diminuído quando as células foram tratadas com IFN- γ , IL-3, IL-10, rP21 e rP21 24h. De forma intrigante, a citocina IL-10 reduz a multiplicação

parasitária em mioblastos C2C12 infectados com TCT Y, mas não em macrófagos peritoneais infectados com esta cepa. Isto sugere uma interação diferente entre IL-10 e as duas células utilizadas no estudo.

Como esperado, a citocina IFN- γ diminuiu a multiplicação de *T. cruzi* em todos os grupos analisados. IFN- γ é uma proteína com 146 resíduos de aminoácidos, sendo o único membro da família IFN do tipo II, e em humanos é codificado pelo locus cromossomal separado do IFN do tipo I, no cromossomo 12q24 (BREAM et al., 2002; FERREIRA et al., 2014). IFN- γ é produzido principalmente por linfócitos T CD4⁺ do tipo 1 (Th1), linfócitos citotóxicos CD8⁺ e células natural killer (NK). Porém, pode ser produzido também por outras células, como linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APCs). Citocinas secretadas por APCs, mais notavelmente IL-12 e IL-18, controlam a produção de IFN- γ e a diferenciação de células capazes de produzirem esta citocina (FERREIRA et al., 2014).

A indução da resposta imune humoral e celular à infecção por *T. cruzi* é altamente controlada por citocinas. Na fase aguda da infecção, IFN- γ possui papel importante no controle da parasitemia (SAMUDIO et al., 1998). A maior parte dos indivíduos que entram na fase crônica da doença permanece na forma indeterminada, a qual é assintomática e representa um excelente equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (DUTRA et al., 2009). A forma indeterminada da doença de Chagas tem sido associada com a produção predominante de citocinas regulatórias, como IL-10 (SOUZA et al., 2007; ANDRADE et al., 2014). É possível que a habilidade em produzir IL-10 tardiamente na fase aguda, esteja relacionada com o controle da resposta e entrada na fase crônica da doença. Este balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias é importante para manter os níveis de parasitas sob controle e ao mesmo tempo evitar dano tecidual (ANDRADE et al., 2014).

Macrófagos ativados estão envolvidos na sinalização de células T CD4⁺ e CD8⁺ *naïves*, o que leva a produção de moléculas inflamatórias, como IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10 e indução da produção de óxido nítrico sintase (iNOS) para produzir NO (CAMUSSI et al., 1991; BRAZÃO et al., 2011). A complexa interação que ocorre entre as células durante a infecção por *T. cruzi*, gera um papel crítico no desenvolvimento da doença. Macrófagos também apresentam antígenos via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II presentes na superfície celular, o que pode estar envolvido nas atividades fagocíticas e secretórias, como também na

produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, o que leva essas células a uma potencial atividade microbida (MAC MICKING et al., 1997). Apesar do fato dos macrófagos apresentarem propriedades microbicidas e ativadoras da resposta imune, vários protozoários parasitas invadem, sobrevivem e se replicam nestas células, com sucesso (KUEHN et al., 2014).

A infecção utilizando amastigotas da cepa G em animais nocautes mostrou susceptibilidade à produção de IL-12 e IFN- γ (a principal citocina responsável pela secreção de IFN- γ é IL-12). Além de iNOS, IFN- γ regula a expressão de uma grande diversidade de genes, incluindo quimiocinas e receptores de quimiocinas, que mostram ter papel preponderante na proteção contra *T. cruzi* mediada por IFN- γ (RODRIGUES et al., 2012a).

Características clínicas e epidemiológicas da doença de Chagas estão relacionadas com a cepa causadora da doença e com a resposta imune presente no hospedeiro. Primeiramente, o parasita infecta a célula hospedeira, por penetração ativa ou por fagocitose promovida pela célula (DUTRA et al., 2014). Posteriormente, o parasita se multiplica no interior da célula e pode também modular a biologia celular. Se a célula em questão faz parte do sistema imune, a principal ação de *T. cruzi* será modular os mecanismos efetores da defesa imunitária (RODRIGUES, 2015).

A citocina IL-3, de caráter pró-inflamatório, reduziu a multiplicação parasitária de ambas as cepas em macrófagos peritoneais. Como dito anteriormente, esta citocina é altamente expressa na fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi* (RODRIGUES, 2015). Assim, ela poderia estar atuando na manutenção do equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro existente na fase crônica da doença. O mecanismo pelo qual ela reduz a multiplicação, aumentando a contenção dos parasitas intracelulares, permanece desconhecido.

A citocina anti-inflamatória IL-10 é expressa por distintas células do sistema imune inato e adaptativo, sendo regulatória de respostas imunes diversas, não somente do perfil Th1 como também Th2 (revisado em O'GARRA, VIEIRA, 2007; TRINCHIERI, 2007; MAYNARD, WEAVER, 2008; MALOY, POWRIE, 2001; SARAIVA, O'GARRA, 2010). Como esperado, o tratamento com a citocina IL-10 não surtiu efeito sob a multiplicação parasitária das cepas G e Y em macrófagos peritoneais, resultado que está respaldado pela literatura, a qual indica que a citocina IL-10 está envolvida com a mudança de fenótipo de macrófagos para M2, o qual está

envolvido na reparação tecidual e diminuição da inflamação (FRAUSTO-DEL-RÍO et al., 2012). Assim, é esperado observar um perfil de alta multiplicação parasitária em macrófagos peritoneais submetidos ao tratamento com IL-10, uma vez que ativados para expressar o fenótipo M2 (FRAUSTO-DEL-RÍO et al., 2012), os mesmos estariam deixando de fornecer um ambiente intracelular hostil para o parasita, devido à interrupção da produção de substâncias tóxicas.

Para verificar o efeito das citocinas e rP21 em células musculares infectadas com TCT G e TCT Y, utilizamos mioblastos C2C12, que derivam do músculo esquelético de camundongos e exibem a maioria das características presentes em mioblastos normais (OLIVEIRA, 2010). É importante analisar o comportamento das diferentes cepas frente ao tratamento com as citocinas em células musculares, uma vez que *T. cruzi* apresenta tropismo por tecido cardíaco e células do músculo liso. Células C2C12, quando infectadas com TCT G e tratadas com IFN- γ , IL-7 e rP21, exibem menor porcentagem de infecção (figura 10-H). O número médio de parasitas por célula está diminuído no tratamento com IFN- γ e IL-10, e o número total de parasitas está reduzido nos tratamentos com IFN- γ , IL-7, IL-10, rP21 e rP21 24 horas (figura 10 – I e J).

Curiosamente, a citocina IL-7 é capaz de reduzir a multiplicação da cepa G em C2C12, e da cepa Y em macrófagos peritoneais. Isto poderia estar relacionado com o aumento da polimerização de actina induzida por IL-7. A proteína rP21, adicionada 24 horas após a infecção, reduziu o número total de parasitas, ainda que de forma menos acentuada que no tratamento com a rP21 realizado no dia da infecção. Isso pode indicar que para melhor eficácia da rP21 na diminuição da multiplicação parasitária, tal proteína deve estar presente e atuante desde o início da infecção.

A proteína rP21, foi eficaz em diminuir a multiplicação parasitária em todas as condições analisadas. Este efeito pode ser atribuído à indução da polimerização de actina, atividade dependente da ativação do receptor CXCR4 (RODRIGUES et al., 2012b). A indução da polimerização de actina em macrófagos por meio do tratamento com a rP21, já havia sido relatada, sendo tal atividade completamente abolida quando houve o tratamento das células com anti-rP21. Foi demonstrado que as atividades de rP21, seriam baseadas na ativação da via de PI3-quinase, de forma independente de AKT (RODRIGUES et al., 2012b).

A polimerização de actina mediada por ARF6 (ADP-ribosylation factor-6), Anexina A2 e N-WASP é de extrema importância para a invasão celular. Por outro lado, a ausência de qualquer uma destas proteínas é suficiente para propiciar um ambiente favorável à multiplicação intracelular dos amastigotas. Este resultado sugere a possibilidade de que a polimerização do citoesqueleto de actina durante a infecção por *T. cruzi* possui um papel importante no controle da replicação do parasita e, por conseguinte, na propagação da doença (CRUZ, 2010).

6.3 Produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS)

Vários estudos demonstram que IFN- γ pode aumentar tanto a morte de *T. cruzi* por ativação de macrófagos *in vitro*, quanto a resistência à infecção *in vivo*, um efeito dependente da síntese de TNF- α e NO por macrófagos infectados (DA COSTA et al., 2014). Embora tripomastigotas de *T. cruzi* sejam capazes de invadir vários tipos de tecidos e tipos celulares no hospedeiro vertebrado, a maioria das cepas e isolados de *T. cruzi* tem um tropismo por tecido cardíaco e ou cardiomiócitos (DA COSTA et al., 2014).

Com base no descrito acima, resolvemos avaliar se, juntamente com o papel na polimerização do citoesqueleto de actina, as diferentes citocinas e a proteína rP21 estariam diminuindo a multiplicação parasitária, pela indução da produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Ao se tratar macrófagos peritoneais com a citocina IFN- γ , o aumento na produção de NO e ROS é evidente (figura 12-A e 13-A). Isto se deve à ativação dos macrófagos gerada pelo tratamento com esta citocina. Em células C2C12, também houve maior produção de NO e ROS, quando comparado ao controle, sendo que o aumento de NO não foi considerado significativo.

Macrófagos infectados com a cepa G e tratados com IFN- γ , também apresentaram maior produção de NO e ROS. Tal efeito não ocorreu em C2C12 infectados com TCT G. Ainda neste último grupo, houve aumento da produção de NO, quando as células foram tratadas com rP21.

Macrófagos infectados com a cepa Y apresentaram maior produção de NO quando tratados com IFN- γ , IL-3, IL-7 e IL-10, enquanto a produção de ROS nestas células estava diminuída nos grupos tratados com IL-10 e rP21 24h. Mioblastos C2C12, de modo semelhante, quando infectados com TCT G, apresentaram maior produção de NO quando tratados com rP21 e

rP21 24h. No entanto, a produção de ROS esteve diminuída quando os mesmos tiveram tratamento com rP21 24h.

Óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio são dois tipos de mediadores envolvidos na eliminação de patógenos e em injúrias teciduais. Óxido nítrico é produzido por diferentes isoformas de NO sintase, entre eles a isoforma induzível (iNOS) que é ativado principalmente por IFN- γ (BOGDAN, 2001). Assim, nossos resultados que demonstram a indução da produção de NO por IFN- γ estão de acordo com o encontrado na literatura.

A citocina anti-inflamatória IL-10 teve atividade de redução na produção de espécies reativas de oxigênio (figura 13), o que também já era esperado, uma vez que esta citocina, quando presente, tende a eliminar o processo inflamatório presente no local, devido a seu papel regulatório (DA COSTA et al., 2014).

Interessantemente, em mioblastos C2C12, a proteína rP21 foi capaz de aumentar a produção de óxido nítrico. Este efeito não foi observado em macrófagos peritoneais. Isto pode ser devido às diferentes interações existentes entre a proteína e os dois tipos celulares. Sabe-se que a rP21 tem papel indutório na inflamação, como descrito por Machado (2014). A mesma, quando utilizada em modelos de implante de esponjas, possui atividade quimiotática para células imunitárias, aumentando os níveis de produção de MPO e NAG (MACHADO, 2014). Além disso, a mesma é potente inibidora de angiogênese, e não consegue exercer atividade quimiotática em células tumorais de Ehrlich (BORGES, 2015). Assim, considerando o fato de que as células de Ehrlich expressam altamente o receptor CXCR4, e sua interação com a rP21 não gera quimiotaxia, podemos inferir que a proteína interage de forma diferencial com os variados tipos celulares. Isso explicaria o efeito na indução de produção de ROS em mioblastos C2C12.

Durante a infecção por *T. cruzi*, NO pode, direta ou indiretamente, modular a maquinaria leucocitária efetora através de diversos mecanismos. Esse processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais *toxicfree* (peroxinitrito e superóxido) gerados após produção de NO, assim como o aumento da resposta inflamatória induzida durante esse tipo de infecção, um papel duplo na imunidade que é usualmente observada para NO. Essa dualidade na resposta imune, já bem esclarecida, é usualmente dependente da concentração e, uma vez desregulada, deve induzir

toxicidade à célula hospedeira, autoimunidade ou persistência do parasito devido à evasão imune, podendo levar a patologia (RODRIGUES, 2015).

NO é envolvido no controle de parasitemia induzida por *T. cruzi* e diretamente elimina o parasito *in vitro*. Tal molécula afeta esse protozoário por modificar quimicamente proteínas contendo cisteínas e/ou por ligação à metalo-proteínas que medeiam processos metabólicos cruciais. A faixa de toxicidade de NO é dependente da sensibilidade do parasito, que difere entre as cepas e de acordo com o microambiente fisiológico (GUTIERREZ et al., 2009). Além disso, essa explosão oxidativa em fagócitos ativados resulta da liberação de ROS (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil, via ativação de NADPH oxidase (NOX) e/ou enzimas mieloperoxidases (MPO).

Citocinas inflamatórias e ROS são importantes para o controle de *T. cruzi*. Enquanto ROS intracelular serve principalmente para a defesa da célula hospedeira contra agentes infecciosos, a liberação extracelular de ROS, quando presente em abundância, diretamente causa danos nos tecidos ao redor ou promove processo inflamatório (GUPTA et al., 2011). É concebível acreditar que NO e ROS devem ter papéis redundantes durante a eliminação de parasitos.

Assim, podemos concluir que o papel na redução da multiplicação de *T. cruzi*, realizado por IFN- γ e pela proteína rP21, pode ser devido tanto à indução da formação de uma barreira física, criada pela polimerização do citoesqueleto de actina, quanto à indução da produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Em relação aos outros tratamentos que reduziram a multiplicação parasitária de *T. cruzi*, são necessários maiores estudos para tentar elucidar o mecanismo envolvido nesta atividade.

Para melhor compreensão dos resultados obtidos, experimentos de citometria de fluxo, utilizando células infectadas com *T. cruzi* (cepas G e Y) serão realizados, a fim de se verificar o estado de polimerização do citoesqueleto de actina nas células infectadas e submetidas aos diferentes tratamentos. Além disso, pretendemos realizar estudos para verificar o papel das citocinas IL-3, IL-7, IL-10, IFN- γ e da proteína rP21 no ciclo celular do parasita, utilizando tanto formas epimastigotas quanto amastigotas. Por último, verificaremos se os tratamentos *in vitro* com as citocinas, alteram a expressão da P21 por *T. cruzi*, o que pode indicar um papel desta proteína na mediação da passagem para a fase crônica da doença, uma vez que tal proteína

poderia estar induzindo maior aumento da polimerização do citoesqueleto de actina, e, consequentemente, criando um ambiente intracelular de maior retenção do parasita dentro da célula.

7. Conclusão

Pode-se concluir que as citocinas IFN- γ , IL-7 e a proteína rP21, são capazes de induzir a polimerização do citoesqueleto de actina. Além disso, as citocinas utilizadas tiveram a capacidade de reduzir a multiplicação parasitária, pelo menos em alguns dos grupos analisados. Esta atividade pode ser atribuída à indução da polimerização de actina, no caso dos tratamentos com IFN- γ , IL-7 e com a proteína rP21.

O tratamento com IFN- γ e a rP21 induziu a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em células infectadas ou não, o que pode contribuir para o efeito destes tratamentos na redução da multiplicação parasitária. As demais citocinas, IL-3 e IL-10, precisam ser melhores analisadas quanto ao mecanismo existente por trás de seus efeitos na diminuição da multiplicação parasitária.

8. Referências Bibliográficas

ABEL, L. C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun.** v. 17, p. 99-107, 2001.

ÁLVAREZ, J. M. et al. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 9, June 2014.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 8, p. 1-10, 2014.

ANDRADE, S. **Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Baiano**. Tese. Universidade da Bahia, p. 123 , 1973.

ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.185–187, 1999.

ÃNEZ, N. et al. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with diferente clinical profiles of acute Chagas' disease. **Tropical Medicine and International Health**. v. 9, n. 12, p. 1319–1326, 2004.

ARAÚJO, F. G. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. **Infection and Immunity**. v. 57, n. 7, p. 2246–2248, 1989.

AZIM, H. A.; KAMAL, N. S.; AZIM J. R. Bone metastasis in breast cancer: The story of RANK-Ligand. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**. v. 24, p. 107–114, September 2012.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14–30 years ago. **J Infect Dis**. v.182, p. 634–638, 2000.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**. v. 162, p. 327-334, 1988.

BARRETO, M. P. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. (Brener, Z., Andrade, Z. A. Eds.) Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 89 -151, 1979.

BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**. v. 75, p. 19–47, 2011.

BICE, D. E.; ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). **J Parasitol**. v. 56, p. 663-670, 1970.

BILATE, A M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v.50, p. 67-74, 2008.

BOMBEIRO, A. L. et al. IL-12p40 deficiency leads to uncontrolled *Trypanosoma cruzi* dissemination in the spinal cord resulting in neuronal death and motor dysfunction. **PLoS ONE**, vol.7, n.11, p. e49022, November 2012.

BORGES, B. C. **Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21 de *Trypanosoma cruzi* sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro*. Dissertação de mestrado.** Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. UFU. Uberlândia, 2015.

BREAM, J. H. et al. A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription. **Genes Immun**. v.3, p. 165-169, 2002.

BRENER, Z. A descoberta (Homenagem aos 80 anos da descoberta da doença de Chagas). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.1-6, 1989.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiololy**, v. 27, p. 347 – 382, October 1973.

BRENIERE, S. F. et al. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. **Acta Trop.** v. 71, p.269–283, 1998.

CAETANO, B. C. et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology.** v.187, n.4, p.1903–1911, 2011.

CAMPOS, E. S. Estudos sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. **Ann Fac Med.** v. 2, p. 197-201, 1927.

CAMPOS, M. A. S. et al. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **Journal of Immunology,** v.167, n. 1, p.416–423, 2001.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and Immunity.** v.64, n.1, p.128–134, 1996.

CASTELLANO, F.; CHAVRIER, P.; CARON, E. Actin dynamics during phagocytosis. **Seminars in immunology,** v. 13, p. 347-355, 2001.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 1, p. 159 – 218, Agosto 1909.

COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Biological Chemistry,** v.280, n.25, p.24085–24094, June 2005.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 102 (Supl. I), p. 113-122, September 2007.

COURA, J. R. E VIAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature,** v. 465, n. 7301, p.S6–S7, June 2010.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 110, p. 277-282, 2015.

CRUZ, L. Estudo do envolvimento de moléculas associadas ao citoesqueleto de actina, ARF6 e anexina A2, e da galectina-3 na invasão e tráfego intracelular de amastigotas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*. 2010. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010

DA COSTA, T. A. et al. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: Toward Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting TcI and TcII Populations. **Journal of Immunology Research.** v. 2014, p. 2-12, ID 962047, 2014.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology.** v. 217, p. 768–777, 2012.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. Chagas disease: fact and reality. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 544 – 545, 2007.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. **Microbes and Infection**. v. 4, n. 9, p. 975–981, 2002.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**. v.185, n.12, p.2061–2068, 1997.

DINIZ, L. DE F. et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, p. e2367, 2013.

DINOIA, J. M. et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J Exp Med**. v. 195, p. 401–413, 2002.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 208–218, 2009.

DUZ, A. L. et al. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 109, p. 1005–1013, 2014.

EEROLA, A. K.; SOINI, Y.; PAAKKO, P. A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. **Clinical Cancer Research**. v. 6, p. 1875–1881, May 2000.

FERNANDES, M. C. et al. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**. v. 15, p. 977–991, June 2013.

FERREIRA, A. V. et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12-13, p. 1002–1005, November 2011.

FERREIRA, L. R. P. et al. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World J Cardiol**. v. 6, p. 782-790, 2014.

FRAUSTO-DEL-RÍO, D. et al. Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. **Cytokine**. v. 57, p. 158–168, 2012.

FREITAS, J. M. et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int J Parasitol**. v. 35, p.411–417, 2005.

GAO, J. Q. et al. Immune Cell Recruitment and Cell-Based System for Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 25, April 2008.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an Larginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor. **European Journal of Immunology**. v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1992.

GOLÇALVES, V. M. et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1 dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.7, n.10, 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** v.126, p. 131-138, 1982.

GRINDLAY, J. H; WAUGH, J. M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. **American Medical Association Archives of Surgery**. v. 63, p. 288-297, 1951.

GUILMOT, A.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Differential IFN- γ production by adult and neonatal blood CD56+ natural killer (NK) and NK-like-T cells in response to *Trypanosoma cruzi* and IL-15. **Parasite Immunology**. v. 36, p. 43–52, 2014.

GUPTA, S.; DHIMAN, M.; WEN, J. J.; GARG, N. J. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. **Adv Parasitol**. v. 76, p. 153–70, 2011.

GUTIERREZ, F. R. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunol**. v. 31, p.673-685, 2009.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, V. 104, p. 236-245, 2009.

HANDMAN, E.; GODING, J. W. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. **EMBO Journal**. v.4, n.2, p.329–336, 1985.

HANSON, W. L.; ROBERSON, E. L. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. **J Protozool**. v. 21, p. 512-517, 1974.

KAWASHITA, S. Y. et al. Maximum – likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. **Mol Biol Evol**. v. 18, p. 2250–2259, 2001.

KUEHN, C.C. et al. Distinctive Histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection . **Parasitology**. v. 141, p. 904–913, 2014.

KURUP, S.P.; TARLETON, R.L. Perpetual expression of PAMPs necessary for optimal immune control and clearance of a persistent pathogen. **Nature Communications**. v. 4, n. 2616, 2013.

LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n.9, p. 1285 – 1300, September 2014.

LOW, H. P. et al. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. **Journal of Immunology**.v.160, n.4, p.1817– 1823, 1999.

MACHADO, F. C. **Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e caracterização biológica da proteína P21-His₆**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 65f. 2014.

MAGALHÃES, L.M.D. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9,p.1-17, 2015.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunol**. v. 2, p. 816–822, 2001.

MARTINS, F. A. **Estudos biológicos da proteína P21-His₆ baseada na P21 nativa de *Trypanosoma cruzi* e seu papel na multiplicação parasitária sob diferentes estímulos**. Monografia (Graduação). Instituto de Biologia – Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. (2013). 52f.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin10 to T Cell mediated immune regulation. **Immunol. Rev**. v. 226, p. 219–233, 2008.

MCCABE, R. E.; MEAGHER, S. G.; MULLINS, B. T. Endogenous interferon- γ , macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Infectious Diseases**. v.163, n.4, p.912–915, 1991.

MEJIA-JARAMILLO, A. M.; PENA, V. H.; TRIANA-CHÁVEZ, O. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. **Experimental Parasitology**. v.121, n.1, p.83–91, 2009.

MINEO, J. R. et al. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

MORAIS, C. G. V. et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**. v. 2015, p. 2-19, ID 324915, 2014.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 1-14, 1991.

MOTT, A. et al. Modulation of Host Cell Mechanics by *Trypanosoma Cruzi*. **J. Cell. Physiol.** v. 218, p. 315–322, 2009.

NAKAYASU, E. S. et al. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. **Proteomics**, v.9, n. 13, p. 3489–3506, July 2009.

NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, N.; CLAUSELL, D. T. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). **Hospital (Rio J)**. v. 73, p.1767-1804, 1968

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 422-28, 2004.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**. v. 267, p. 5421-5426, September 2000.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin 10. **Nature Rev. Immunol.** v. 7, p. 425–428, 2007.

OLIVEIRA, E. N. **Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na viabilidade, proliferação, adesão e diferenciação em células musculares C2C12**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação. Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP. 57f. 2010.

OLIVEIRA, A. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **Journal of Immunology**. v. 173, n.9, p.5688–5696, 2004.

OLIVEIRA, L. R. C.; PICKA, M. C. M.; NICOLETE, V. C.; CALVI, S. A.; MARCONDES-MACHMARADO, J. Organ tropism during the acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c mice. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.18, n. 1, p. 34-43, 2012.

PEREIRA, M. et al . Down Regulation of NO Signaling in *Trypanosoma cruzi* upon Parasite-Extracellular Matrix Interaction: Changes in Protein Modification by Nitrosylation and Nitration. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9, p. 1-21, DOI:10.1371/journal.pntd.0003683, 2015.

PETRAY, P.; CATAÑOS-VELEZ, E.; GRISTEIN, S.; ORN, A.; ROTTENBERG, M.E. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, v. 47, p. 121-126, 1995.

PIMENTEL, W. DE S. et al. The effect of beta-blockade on myocardial remodelling in Chagas' cardiomyopathy. **Clinics (Sao Paulo)**. v. 76, p. 1063-1069, 2012; 67.

PINAZO, M. J. et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v.12, p. 479-496, 2014.

PINTO, A. V. et al. Polysaccharide fraction of *Agaricus brasiliensis* avoids tumor-induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma. **Cellular Immunology**. v. 256, p. 27-38, February 2009.

POVEDA, C. et al. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). **PLoS ONE**. v. 9, p. 1-8, 2014.

PROCÓPIO, D. O.; SILVA, S.; CUNNINGHAM, C. C.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 1-13, 1998.

REED, S.G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.140, p. 4342-4347, 1998.

RODRIGUES, A. A. **Estudos da interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro mamífero enfatizando a resposta imunológica e caracterização biológica da proteína p21 do parasito.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 161f. 2015.

RODRIGUES, A. A. et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis, **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012b.

RODRIGUES, A. A. et al. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain, **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 4, 2012a.

RODRIGUEZ, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. **Infection and Immunity**. v.31, n.2, p.524–529, 1981.

ROLÓN, M. et al. Development of a resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. v. 99, p. 103-7, July 2006.

SAMUDIO, M. et al. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.58, n.1, p.119– 121, 1998.

SANTOS, M. A. et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**. v. 4, p. 4259, 2014.

SANTOS-VANNIER, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**. v.8, n.4, p.297–318, 2002.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL 10 production by immune cells. **Nature reviews Immunology**. v. 10, n 171, 2010.

SARDINHA, L. R. et al. Contribution of NK, NK T, $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**. v. 74, n. 4, p. 2031–2042, 2006.

SARDINHA, L. R. et al. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.4, n.1, 2010.

SHOEMAKER, J. P.; HOFFMAN, R. V. JR.; HUFFMAN, D. G. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Exp Parasitol*, v. 27, p. 403- 407, 1970.

SILVA N. N. et al. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 10, p. 265-276, 1968.

SILVA, C. V. et al. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, April 2009.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**. v.184, n.3, p.1148– 1152, 2010.

SILVA, G. K et al. Apoptosis- associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 β response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**. v. 191, n.6, p.3373–3383, 2013.

SILVA, R. R. et al. Interferon-Gamma Promotes Infection of Astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**. v. 10, p. 1-23, 2015.

SOUSA, G. R. et al. Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. **Plos One**. v. 9, p. 1-9, 2014.

SOUZA, P. E. et al. *T. cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect Immun**. v.75, p.1886–1894, 2007.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas: mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, p.32-38, 2005.

TALIAFERRO, W. H.; PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**. v. 96, p. 199- 226, 1955.

TAY, J. et al. Estudos sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inv Salud Publica (Mex)**. v. 33, p. 67-76, 1973.

TEIXEIRA, T. L. **Proteínas relacionadas ao citoesqueleto e vias de sinalização envolvidas no tráfego intracelular de *Leishmania amazonensis*: efeito da proteína P21-His6 de *Trypanosoma cruzi* em infecção por *Leishmania amazonensis* in vivo.** Dissertação de

Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 111p. 2014.

TEIXEIRA, V. de P. et al. Correlation between adrenal central vein parasitism and heart fibrosis in chronic chagasic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.56, n.2, p.177–180, February 1997.

TETE, S. et al. Interleukin-9 and mast cells. *Journal of biological regulators and homeostatic agentes*, p. 329-326, 2012.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell migration. **Comprehensive Physiology**. v. 4, p. 2369 -2392, 2012.

TRINCHIERI, G. Interleukin 10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.** v. 204, p. 239–243, 2007.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitaemia and directly kills parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5177-5182, 1994.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”. Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v. 3, p. 276 – 293, 1911.

WATKINS, R. Comparison of infections produced by two strains of *Trypanosoma cruzi* in mice. **J Parasitol**, v. 52, p. 958-961, 1966.

WENZEL, U. A. et al. *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. **FASEB Journal**. v.26, n.1, p.29–39, 2012.

World Health Organization (WHO) The World Health Report 2015: Chagas disease. **World Health Organization**, 2015.

YIN X. Y. et al. Prognostic significances of tumor-infiltrating S-100 positive dendritic cells and lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatogastroenterology**. v. 50, p.1281–1284, October 2003.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 104, p.1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. v.12, n.2, p.240–253, 2012.