

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

A IMUNIZAÇÃO COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE P21 DIMINUI A CARGA
PARASITÁRIA E REDUZ A FIBROSE NO CORAÇÃO DOS ANIMAIS INFECTADOS
POR *Trypanosoma cruzi*.

Cassiano Costa Rodrigues

Uberlândia
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

A IMUNIZAÇÃO COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE P21 DIMINUI A CARGA
PARASITÁRIA E REDUZ A FIBROSE NO CORAÇÃO DOS ANIMAIS INFECTADOS
POR *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas
da Universidade Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do título de mestre.

Discente: Cassiano Costa Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientador: Dr. Marlus Alves dos Santos

Uberlândia
Fevereiro - 2018

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

- R696i
2018
- Rodrigues, Cassiano Costa, 1988
A Imunização com a proteína recombinante p21 diminui a carga parasitária e reduz a fibrose no coração dos animais infectados por *Trypanosoma cruzi* / Cassiano Costa Rodrigues. - 2018.
79 f. : il.
- Orientador: Claudio Vieira da Silva.
Coorientador: Marlus Alves dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.174>
Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas, Doença de - Teses. 4. Imunização - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da. II. Santos, Marlus Alves dos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
IV. Título.

CDU: 576.3

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucimar e César, que fizeram dos meus sonhos seus próprios objetivos e dos meus objetivos sua razão para lutar.

“Dá pra viver, mesmo depois de descobrir que o mundo ficou mal, é só não permitir que a maldade do mundo lhe pareça normal, pra não perder a magia de acreditar na felicidade real e entender que ela mora no caminho e não no final.”

Kell Smith

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por proporcionar-me saúde para estar presente em todos os momentos junto daqueles que realmente amo. Permitindo-me viver com serenidade, amor e respeito com aqueles que me acompanham nessa caminhada.

À minha família (mãe, pai e irmãos) que sempre trouxeram nos olhos a fé que eu conseguiria, ensinando-me a lutar mesmo quando o cansaço e os motivos para desistir fizeram morada em mim. Foram eles que me sustentaram e sem a ajuda deles não teria conseguido lidar com os desafios, adversidades e dificuldades que nortearam meus caminhos.

Ao meu professor e orientador Dr. Cláudio Vieira da Silva que sempre esteve disposto a me ajudar construir uma bagagem acadêmica, incentivando-me sempre a buscar o aprimoramento pessoal e profissional através das inúmeras oportunidades que me foram ofertadas por suas mãos. Serei eternamente grato pelas várias portas e caminhos que surgiram, e por ter me recebido de braços abertos.

À toda equipe do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pelos ensinamentos e companheirismo. Mas em especial quero agradecer ao Dr. Marlus Alves dos Santos e Msc. Thaise Lara Teixeira que me ensinaram, formaram-me como pesquisador e acolheram-me com tanto carinho. Essa equipe de excelentes profissionais fez a diferença em minha vida e tornaram-me um ser humano melhor.

Por fim, quero agradecer também aos meus amigos, familiares e tantos outros professores e profissionais que acrescentaram tanto com palavras de motivação e apoio. As instituições que apoiam e incentivam a educação nesse país como: Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse realizado.

LISTA DE ABREVIACÕES

μL	Microlitros
AE	Amastigotas extracelulares
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos
BL-21	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina sérica bovina)
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
cm ²	Centímetro quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
CBEA	Centro de bioterismo e experimentação animal
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (Receptor de quimiocina do tipo 4)
DC	Doença de Chagas
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
ERK	Quinase regulada por Sinal Extracelular
gp82	Glicoproteína de superfície de 82 kDa
HE	Hematoxilina e eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)carboxylic acid</i> (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
h	Horas
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
ImageJ	<i>Image Processing and Analysis in Java</i> (Programa de domínio público para análise de imagens)
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> (Indutor de síntese proteica)
IP3	Trifosfato de inositol

kDa	Kilo Dalton
MPO	Mieloperoxidase
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
nM	Nanomolar
min	Minutos
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetilglicosaminidase
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
OD	<i>Optical density</i> (Densidade ótica)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% de azida
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
Rpm	Rotações por minuto
rP21	Proteína recombinante P21
PM	Peso molecular
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (Meio do Instituto Roswell Park Memorial)
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SDS-PAGE	Docecil sulfato de sódio (SDS) eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)
SFB	Soro fetal Bovino
TCT	Tripomastigotas de cultura de tecido
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UV	Ultravioleta
VERO	Fibroblasto de rim de macaco verde da África

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de imunização dos animais com rP21	32
Tabela 2 – Protocolo de imunização dos animais com rP21 e adjuvante de Freund.....	35
Tabela 3 - Valores de referência para camundongos BALB/c (SANTOS, et. al 2016).	45
Tabela 4 – Caracterização qualitativa e semi-quantitativa do processo inflamatório em cortes histológicos de tecido cardíaco de animais infectados por T. cruzi.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> , ciclo de vida no hospedeiro invertebrado e vertebrado, esquema do mecanismo de transmissão vetorial e complicações da fase crônica da DC em humanos.	17
Figura 2 - Esquema do protocolo de purificação da proteína rP21 por cromatografia de afinidade em coluna de níquel	31
Figura 3 – Gel de SDS-PAGE da rP21, obtenção e avaliação da pureza	42
Figura 4 - Detecção de anticorpos IgG total anti-rP21 durante três semanas de imunizações com rP21	43
Figura 5 - A proteína rP21 não gera tolerância e sua afinidade antígeno-anticorpo apresenta ligações fortes e duradoura	47
Figura 6 - A imunização com rP21 reduz o número de parasitos na corrente sanguínea dos animais infectados por <i>T. cruzi</i> durante a fase aguda.....	48
Figura 7 – Análise da área dos órgãos; coração e baço dos animais imunizados ou não com rP21 na fase crônica da infecção por <i>T. cruzi</i>	49
Figura 8 - Análise dos dados representativos do qPCR em tempo real	52
Figura 9 – Redução da carga parasitária no tecido cardíaco dos animais imunizados com rP21 durante a fase crônica da infecção por <i>T. cruzi</i>	53
Figura 10 - O processo de imunização com a proteína rP21 associada ao Adjuvant de Freund é capaz de retardar a fibrose tecidual no coração dos animais infectados com <i>T. cruzi</i>	56
Figura 11 - A imunização com a proteína recombinante rP21 reduz a quantidade de colágeno do tipo I e III.....	57
Figura 12 - A imunização com a proteína recombinante rP21 resultou em níveis mais elevados de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-rP21 na fase crônica.....	59

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
Resumo	13
Abstract.....	14
1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	15
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.2 Doença de Chagas.....	18
1.3 Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC).....	20
1.4 Proteína rP21.....	22
1.5 Interação antigênica do <i>T. cruzi</i> com o sistema imunológico do hospedeiro	24
1.6 Modelos de imunização com antígenos recombinantes de <i>T. cruzi</i> associados a <i>Adjuvante de Freund</i> contra a DC.	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Aspectos éticos e legais.	29
3.2. Animais.	29
3.3. Purificação da proteína rP21.....	29
3.4. Imunização com rP21 em camundongos saudáveis.....	31
3.5 Parâmetros hematológicos	32
3.6. Ensaio de tolerância a rP21 em camundongos saudáveis.	32
3.7. Pesquisa de anticorpos IgG total anti-rP21 no soro	33
3.8. Células e parasitas.....	34
3.9. Imunização com rP21 e Adjuvante de Freund.....	34
3.10. Ensaio de invasão <i>in vivo</i>	35
3.11. Parasitemia.....	36
3.12. Coleta de órgãos e análise macroscópica.....	36
3.13. Extração de DNA.....	36
3.16. Inclusão na parafina.	37
3.17. Análise histopatológica.....	38
3.18. Coloração com <i>Picrosirius Red</i>	38

3.19. Ensaio de titulação de anticorpos anti-rP21 IgG total, IgG1 e IgG2a no soro dos animais infectados.....	40
3.20. Normas de Biosegurança	40
3.21. Análise estatística	41
4. RESULTADOS	41
4.1 Purificação, determinação da pureza e concentração da rP21	41
4.2 A rP21 tem a capacidade de induzir uma resposta imune humoral com produção de anticorpos IgG total anti-rP21.....	42
4.3 Animais imunizados com rP21 apresentou número maior de linfócitos circulantes na corrente sanguínea	43
4.4 A rP21 estimula uma resposta imune específica e não gera tolerância imunológica	46
4.5 A imunização com rP21 favoreceu a diminuição do número de parasitas no sangue de animais infectados por <i>T. cruzi</i>	47
4.7 Avaliação morfométrica do baço e do coração de animais imunizados com rP21 e na fase crônica da infecção experimental por <i>T. cruzi</i>	48
4.7 A imunização de animais infectados por <i>T. cruzi</i> com rP21 reduziu a carga parasitária no tecido cardíaco.	49
4.8 Administração de rP21 em associação com Adjuvante de Freund melhora a resposta imunológica contra a infecção por <i>T. cruzi</i>	53
4.9 Imunização com rP21 reduz a fibrose tecidual no coração dos animais infectados por <i>T. cruzi</i>	54
4.10 A imunização com rP21 aumenta consideravelmente os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-rP21.....	58
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS	70

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, é disseminado na natureza, circulando entre hospedeiros triatomíneos e mamíferos silvestres, podendo infectar humanos e causar complicações cardíacas no processo infeccioso. Durante a invasão celular, ocorrem muitas interações entre as moléculas que são secretadas e da superfície do parasita com os receptores de superfície da célula hospedeira, resultando na internalização do parasita. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa, identificou em *T. cruzi*, uma nova proteína de 21 kDa, envolvida na invasão celular, designada P21. A forma recombinante da P21 nativa (rP21) é utilizada em estudos sobre aspectos biológicos de *T. cruzi*, fornecendo evidências de sua atividade na infecção pelo protozoário. O presente trabalho teve como objetivo investigar diferentes estratégias de imunização com rP21 em camundongos infectados ou não por *T. cruzi* para entender a interação desta proteína com o sistema imunológico do animal, bem como identificar um esquema de imunização que reduzisse a fibrose causada pela infecção crônica e promovesse a preservação do tecido cardíaco. Os resultados indicam que a imunização com a proteína rP21 associada ao Adjuvante de Frenud controlou a parasitemia na fase aguda, aumentou as populações de células de defesa do sistema imunológico, e reduziu a carga parasitária tanto na fase aguda quanto na crônica. Ainda, observou-se uma resposta imunológica humoral robusta, por meio de produção de anticorpos IgG2a anti-rP21 que promoveu uma menor deposição de fibras colágenas no tecido cardíaco.

Palavra-chave: *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, imunização, proteína rP21, fibrose cardíaca, Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is widely distributed in nature, circulating between its hosts, triatomine bugs and wild mammals; it can naturally be transmitted to humans resulting in heart disease parasite-induced. During the cell invasion process, many interactions occur between the molecules from parasite surface or secreted receptors of the host cell. In this context, our research group identified in *T. cruzi*, a new protein of 21 kDa, involved in the cellular invasion, named P21. The recombinant form of native P21 (rP21) is used in studies on biological aspects of *T. cruzi*, providing elucidation of its function in protozoan infection. The present study aimed to investigate different strategies of immunization using rP21 in mice infected or not by *T. cruzi* to understand the interaction of this protein with their immune system, as well as to identify an immunization schedule that could reduce the fibrosis caused by the chronic infection and promote the preservation of cardiac tissue. This study showed that immunization with the rP21 protein associated with Freud's Adjuvant was able to control parasitemia in the acute phase, increased the immune system cell populations, followed by reduction of parasitic burden on cardiac tissue. In addition, a robust humoral immune response was observed, characterized by the production of anti-rP21 IgG2a antibodies that promoted decreased deposition of collagen fibers in cardiac tissue.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, immunization, rP21 protein, cardiac fibrosis, Chronic Chagas' Cardiomyopathy.

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um protozoário unicelular flagelado, pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e está entre os mais bem-sucedidos parasitos intracelulares; tem como característica um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados, desenvolvendo diferentes formas evolutivas de acordo com a fase do ciclo e do hospedeiro (WALKER et al., 2013).

Poucos protozoários comparam-se ao *T. cruzi* em termos de virulência e capacidade de infectar vários tipos de células nucleadas (NUNES et al., 2013). A invasão das células de mamíferos por *T. cruzi* mobiliza diversas estruturas celulares como: receptores de membrana, citoesqueleto de actina, lisossomos, etc; o parasito usa essas estruturas da célula hospedeira durante o processo de infecção, ativando mecanismos celulares distintos e causando diferentes sintomas no hospedeiro, os quais caracterizam a Doença de Chagas (DC) (MORTARA et al., 2008).

O parasita apresenta três formas de desenvolvimento distintas: tripomastigotas (Figura 1A), amastigotas (Figura 1B) e epimastigotas (Figura 1C); cada estágio apresenta alterações morfológicas e genéticas que permitem ao parasita se adaptar a diversos microambientes no hospedeiro invertebrado (Figura 1D) e vertebrados (Figura 1 E) (DE SOUZA, 1984; TEIXEIRA et al., 2011). Sua transmissão se dá a partir do repasto sanguíneo por um inseto hematófago triatomíneo da família Reduviidae (Figura 1F); o repasto é realizado em mamíferos, incluindo o homem e outros animais, enquanto o inseto se alimenta de sangue do hospedeiro elimina fezes e urina pelo sistema excretor, liberando formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (RASSI ; MARIN-NETO, 2010). A forma tripomastigotas metacíclicos penetra no hospedeiro por meio do local da picada, ou escoriações na pele, atingindo a corrente sanguínea, uma vez em seu novo hospedeiro invade várias células nucleadas, permanecendo temporariamente em um vacúolo parasitóforo intracelular, onde se diferencia em amastigotas que são formas infectivas, apresentam morfologia arredondada e sem flagelo externo; como consequência, por ser uma forma evolutiva replicativa do parasita, após o rompimento do vacúolo, multiplicam-se intensamente no citoplasma por divisão binária (PATINO ; RAMÍREZ, 2017).

Após a divisão no citoplasma da célula, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, rompem a membrana da célula hospedeira, vão para órgãos e tecidos distantes

pela corrente sanguínea podendo, em seguida, reiniciar um novo ciclo celular; a partir daí podem ser reconhecidos e destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro ou serem ingeridos por um novo inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo (BRENER, 1973; DE SOUZA, 2002; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Após serem ingeridos pelo triatomíneo, diferenciam-se em epimastigotas no estômago do vetor, estas são formas não infectivas que replicam-se intensamente no intestino médio do vetor, para em seguida se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos devido a um estresse nutricional que são submetidos na porção mais distal do intestino, podendo reiniciar o ciclo no próximo repasto (Figura 1 D) (CARREA E DIAMBRA, 2016). Além da transmissão através do inseto, o parasita pode ser transmitido por via oral que representa a rota de transmissão mais frequente no Brasil, devido ao consumo de alimentos contaminados como; açaí e caldo de cana de açúcar (ANDRADE et al., 2014; PEREIRA et al., 2010), via congênita (GEBREKRISTOS; BUEKENS, 2014), por transfusão sanguínea (LEIBY et al., 2017), doação de órgãos, e até mesmo por acidentes laboratoriais (KINOSHITA-YANAGA et al., 2009).

O processo de invasão celular por *T. cruzi* pode ser dividido em três estágios bem delimitados como: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão; neste contexto, diferentes cepas de *T. cruzi*, bem como, diferentes formas do parasito podem expressar diversas moléculas em sua superfície ou podem secretar diferentes proteínas que interagem com as células do hospedeiro e exercem um papel importante na invasão celular (SILVA et al., 2009).

O *T. cruzi* tem a capacidade de invadir e replicar no interior de muitas células nucleadas, mas exibe um tropismo especial por células musculares lisas e, principalmente cardiomiócitos do hospedeiro vertebrado (WOOLSEY et al., 2003). Em estudos realizados por DVORAK E HYDE (1973), ampliou-se o conhecimento sobre o processo de invasão de *T. cruzi*, onde foi demonstrado que, durante a entrada de tripomastigotas na célula, não há protusões ou formações de grande quantidade de projeções da membrana celular do hospedeiro. Entretanto, com o avanço de algumas pesquisas foi possível verificar a forte associação entre o parasito e a membrana da célula hospedeira, onde se visualizou, após a internalização, a formação de um vacúolo contendo o parasita (FERNANDES; ANDREWS, 2012).

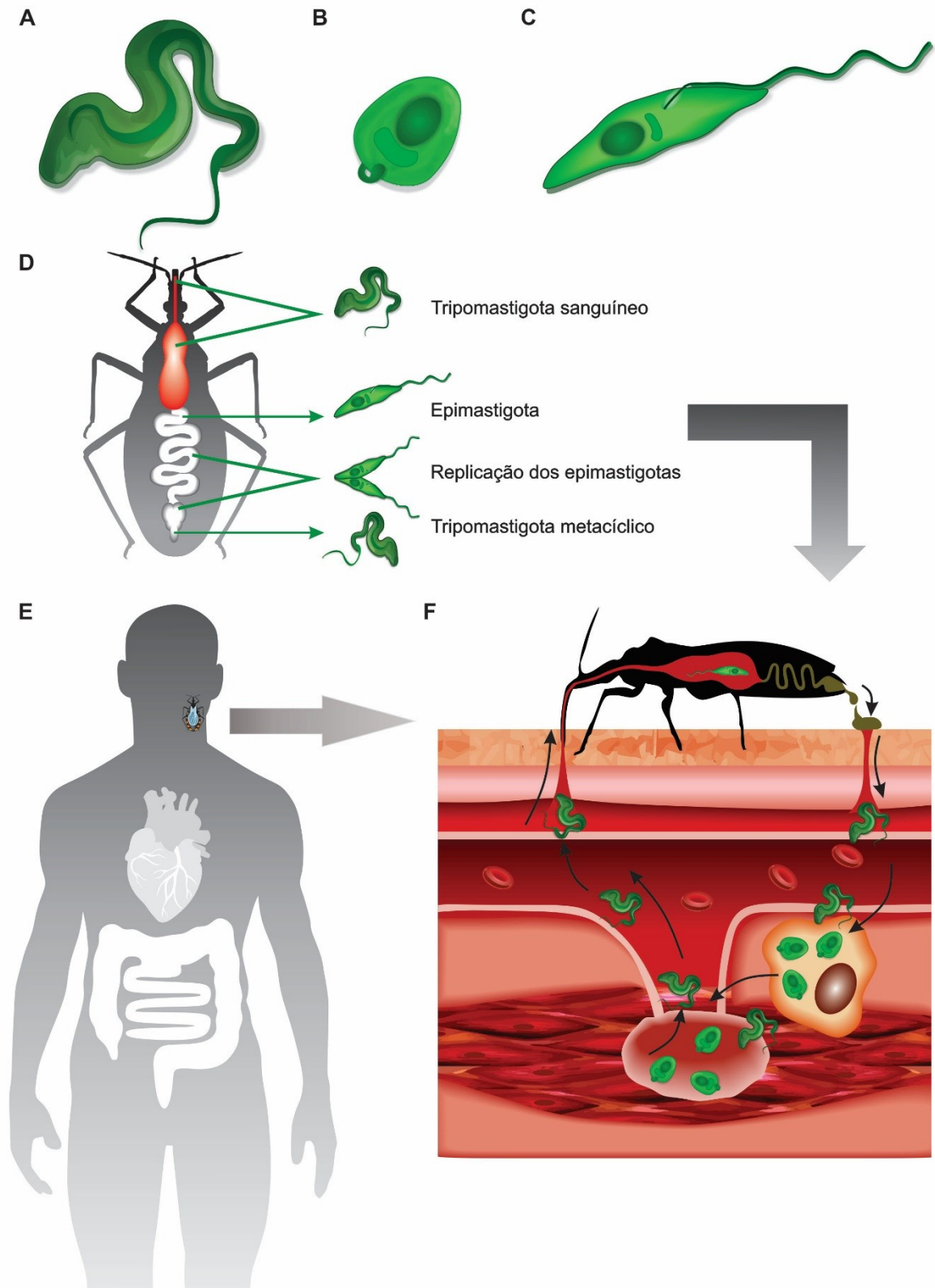


Figura 1 – Formas de desenvolvimento do *T. cruzi*, ciclo de vida no hospedeiro invertebrado e vertebrado, esquema do mecanismo de transmissão vetorial e complicações da fase crônica da DC em humanos. A) tripomastigota, B) amastigota e C) epimastigota. D) Ciclo de vida de *T. cruzi* no hospedeiro triatomíneo. E) Ciclo de vida de *T. cruzi* no hospedeiro humano e suas complicações na fase crônica da doença (megacólon e cardiomegalia). Fonte: Tese de doutorado de Marlus Alves dos Santos (UFU).

Estudos apontam a participação de inúmeras moléculas de superfície do parasita que se associam a grupos de carboidratos presentes em receptores na superfície da célula hospedeira (SANTOS et al., 2016). Muitos desses receptores celulares são explorados pelo parasito para mediar a invasão celular e garantir a sua sobrevivência intracelular (BORGES et al., 2016). Dentre esses trabalhos, alguns descrevem algumas moléculas responsáveis pela interação *T. cruzi* - célula hospedeira, nesses processos de adesão e internalização, várias moléculas das células hospedeiras já foram descritas como receptores de moléculas de *T. cruzi*, sendo um grande número da família dos carboidratos, como resíduos de galactosil, manosil ou sialil (BARRIAS et al., 2013). Entre essas proteínas estão as lectinas, como galectina-3, que também podem se ligar a resíduos de carboidratos do parasito; essas moléculas de *T. cruzi* estão associadas a invasão, podendo ser proteínas de superfície (ligadas a membrana plasmática) ou secretadas pelo parasito durante o processo de instalação da infecção (REIGNAULT et al., 2014); um importante exemplo de proteína secretada pelo parasita que contribuem significativamente no processo de infecção por *T. cruzi* é a proteína P21 (SILVA et al., 2009) discutida adiante.

1.2 Doença de Chagas

A DC foi descoberta e descrita pelo médico sanitário e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (antes chamado de Instituto Soroterápico Federal) Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em abril de 1909, sendo que o agente etiológico é o protozoário *T. cruzi*, conforme referido previamente; o parasita foi nomeado em homenagem a Osvaldo Cruz, representando uma descoberta importante e de sucesso em toda a história da medicina brasileira (COURA; BORGES PEREIRA, 2010). Atualmente a DC é um dos principais problemas de saúde pública, sendo considerada uma das doenças tropicais negligenciadas mais prevalentes, acometendo cerca de 6 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2017). A DC traz um impacto negativo na economia de países em desenvolvimento por apresentar uma taxa de mortalidade considerável (aproximadamente 10.000 mortes por ano); estima-se que cerca de vinte e cinco milhões de pessoas estejam em zonas de risco, aumentando os desafios, enquanto as perspectivas globais demonstram que mais de 80% dos indivíduos afetados pela doença não tem acesso ao diagnóstico e tratamento adequado (WHO, 2017).

A DC caracteriza-se por apresentar duas fases distintas, aguda e a crônica (STANAWAY; ROTH, 2015). Logo após a infecção por *T. cruzi* a fase aguda se estabelece, sendo caracterizada por febre, mal-estar, esplenomegalia, hepatomegalia e parasitemia elevada,

devido à presença de muitos tripomastigotas no sangue dos pacientes; essa fase possui duração variável tanto na infecção humana quanto na experimental, de seis a oito semanas em média (NUNES et al., 2013). A fase crônica da doença tem início logo após a fase aguda, os indivíduos podem desenvolver quadros clínicos variados, desde brandos a muito graves, e os parasitos são raros no sangue, mas estão presentes no interior das células de outros tecidos; após um período assintomático que pode levar anos, de acordo com cada indivíduo, torna-se evidente o comprometimento de alguns órgãos, como o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico (DIAS et al., 2016).

O desenvolvimento da fase crônica pode levar a complicações cardíacas e digestivas que necessitam de tratamentos longos e procedimentos cirúrgicos, aumentando os custos com a doença; nesta fase, pode-se desenvolver a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), descrita no próximo tópico, a qual se estabelece apresentando lesões cardíacas em pessoas economicamente ativas em países endêmicos (BENZIGER et al., 2017; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014); o que acaba por determinar uma condição de morbidade e muitas vezes uma taxa de mortalidade precoce da população, resultando em perdas econômicas importantes (PEREIRA JÚNIOR; MARKMAN FILHO, 2014).

Muitos são os esforços para controlar a doença: conhecer melhor a biologia do *T. cruzi* e sua interação com o ser humano, a patogenia e fisiopatologia das complicações na fase crônica, assim como tratar de forma mais adequada e efetivamente as manifestações cardíacas e digestivas tardias; embora também seja necessário adotar iniciativas que possibilitem o adequado manejo das condições sociais e médicas resultantes da migração de indivíduos infectados para países onde a doença não existia (COURA, 2015). Inúmeras campanhas organizadas e coordenadas para se obter o controle da transmissão vetorial e transfusional proporcionaram significativa redução de novos casos; o Brasil recebeu em junho de 2006 o certificado de controle da transmissão pelo vetor silvestre *Triatoma infestans*; isso não representa a erradicação, pois surtos isolados e registros de casos agudos continuam a ocorrer em vários estados brasileiros tendo como vetores outras espécies de triatomíneo (WHO, 2017).

Com a globalização da DC, cria-se um novo problema epidemiológico, econômico, social e político mundial pela migração de indivíduos cronicamente infectados por *T. cruzi* dos países endêmicos para os não endêmicos, principalmente Estados Unidos (EUA), Canadá, Espanha, França, Suíça, Itália, Japão, países emergentes da Ásia e Austrália. Estima-se que nos EUA 300.000 indivíduos estejam infectados por *T. cruzi*, sendo que 30.000 a 45.000 tiveram manifestações clínicas. Desde então tornou-se obrigatório, a partir de 2007, a triagem nos doadores de sangue e de órgãos naquele país. (COURA, 2015; CARREA et al., 2016).

Surge a necessidade de padronizar métodos mais confiáveis de detecção da infecção por *T. cruzi*, não somente para efeito diagnóstico, mas crucialmente, como critério de cura. Através de novos métodos para o tratamento de milhões de pacientes cursando a fase crônica da doença, o que representa também uma incógnita a ser desvendada; registra-se atualmente um interesse dos pesquisadores em tal área, incluindo novas perspectivas de estudos que focalizem a associação de novos medicamentos mais eficazes que o benznidazol (CEVEY et al., 2016).

Espera-se também a determinação da real eficácia dos tratamentos, no intuito de impactar positivamente sobre a história natural da doença em sua fase crônica; aos cardiologistas incumbe o aperfeiçoamento do manejo clínico adequado de seus pacientes chagásicos, de tal maneira que possam administrar-lhes, o quanto antes possível, medicamentos e intervenções que atuem na fisiopatologia peculiar da doença, não desperdiçando oportunidades terapêuticas plausíveis e promissoras (PEREIRA JÚNIOR; MARKMAN FILHO, 2014).

1.3 Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)

Baseando-se em evidências de ordem experimental e clínicas firmadas recentemente, a fisiopatologia da CCC apresenta: alterações inflamatórias degenerativas e fibróticas, disfunção sinusal, bloqueios atrioventriculares e intraventriculares, arritmias ventriculares por reentrada, discinergias ou aneurismas ventriculares, predisposição a complicações tromboembólicas, progressivo dano ao miocárdio, insuficiência cardíaca de padrão cardiomiopático dilatado e biventricular. A CCC é primordialmente uma miocardiopatia dilatada, em que a inflamação crônica, usualmente de baixa intensidade, mas incessante, provoca destruição tissular progressiva e fibrose extensa no coração (DUMONTEIL et al., 2012).

Inúmeros pacientes com CCC manifestam sintomas anginoides, com alterações eletrocardiográficas sugestivas de isquemia e variados defeitos perfusionais miocárdicos detectados por cintilografia; em geral, pode-se admitir que distúrbios, detectados em modelos experimentais de infecção por *T. cruzi* em humanos com DC, contribuam como amplificadores dos efeitos inflamatórios que culminam em produzir isquemia miocárdica (SANTOS et al., 2016). Atualmente, surge o consenso de que a essência da patogenia da CCC resida na inflamação diretamente dependente da persistência parasitária e da consequente resposta imunopatológica adversa; sendo assim, resgata-se a noção de que, mesmo em sua fase crônica, a cardiopatia seja essencialmente um processo inflamatório infeccioso (MORILLO et al., 2015).

Dada a importância da participação do processo inflamatório associado a persistência do parasita no tecido cardíaco, essa interação envolve uma complexa rede de moléculas, glicoproteínas e proteoglicanos que atuam nas propriedades biofísicas e bioquímicas do tecido (BENZIGER et al., 2017). No entanto, quando sintetizadas em excesso desorganizam a dinâmica da Matrix extracelular (ECM) do miocárdio que depende do equilíbrio entre a produção e a degradação principalmente de colágeno I, III e V (LÓPEZ et al., 2005). Sendo assim, um processo inflamatório intenso pode resultar na diminuição de outras proteínas como as metaloproteinases, uma vez que a mesma é responsável pela degradação do colágeno, remodelação e reparo tecidual, o que leva a uma arquitetura anormal que está relacionada ao desenvolvimento de diversas patologias; entre elas a fibrose (CUNHA-NETO et al., 2014). Considerando o tecido fibroso na disfunção miocárdica presente na CCC que pode resultar em insuficiência cardíaca, a avaliação invasiva da fibrose pode ser uma ferramenta clinicamente útil em pacientes chagásicos que podem receber estratégias farmacológicas cardioprotetoras e cardioreparativas (NISHAKI MEHTA et al., 2016).

Há evidências de que reações imunológicas ocorram na CCC, por mimetismo molecular, devido à ativação policlonal dentre outros mecanismos, sendo que é menos elucidado se a agressão às estruturas cardíacas é dependente da resposta imunológica ou se a mesma é decisiva para a instalação das lesões características da cardiomiopatia crônica da DC; admite-se que a vigência de um mecanismo adequado de imunorregulação seja fator crucial para se diferenciar os indivíduos que controlariam sua infecção sem desenvolver dano tecidual importante (através de resposta inflamatória controlada e limitada) daqueles que evoluíram com doença grave, com inflamação intensa, necrose e fibrose reativa (PEREIRA JÚNIOR et al., 2014).

São utilizados dois fármacos no tratamento que são comprovadamente tripanosomicidas, o nifurtimox e o benznidazol (URBINA; DOCAMPO, 2003). O primeiro não é disponível para uso generalizado no Brasil e o segundo sua ação é mais eficaz na fase aguda da doença, seus efeitos colaterais são: anorexia (o mais intenso e frequente), dor abdominal, náuseas, vômitos e emagrecimento (CEVEY et al., 2016). Para muitos pesquisadores e especialistas, os pacientes adultos já com a forma indeterminada ou com a CCC estabelecida, a indicação para o tratamento permanece controversa, sendo que, alguns pesquisadores entendem ser defensável a conduta de tratar com base em evidências experimentais de que o tratamento atenua a progressão da cardiopatia, divulgada e defendida por grupos distintos de pesquisadores; para tentar nortear conclusivamente o dilema, frente aos riscos opostos de cometer-se erros, está em andamento uma investigação multicêntrica internacional,

randomizada, duplo-mascarada e controlada por placebo, que vai avaliar a evolução clínica por 6 anos de pacientes com CCC tratados com benznidazol. (MORILLO et al., 2015).

1.4 Proteína rP21.

Nosso grupo de pesquisadores identificou em *T. cruzi* uma nova proteína de 21 kDa que está envolvida na invasão celular, a qual foi nomeada como P21 (SILVA et al., 2009). A proteína P21 é caracterizada como uma proteína ubíqua, secretada por todas as formas evolutivas de vida do parasita (SILVA et al., 2009). Estudos apontam diferenças entre a expressão de proteínas, incluindo a P21, nas mais diferentes cepas de *T. cruzi*. Silva e colaboradores (2009), através da tecnologia de DNA recombinante, clonaram o gene da proteína P21 nativa, inserindo sua sequência gênica em um plasmídeo, o qual foi incorporado ao genoma de bactérias *E. coli* tendo em vista obter a forma recombinante dessa proteína. Possuindo 18 kDa e apresentando uma cauda de poli-histidina, a purificação da proteína recombinante P21 (rP21) pode ser realizada a partir de culturas de *E. coli* por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Figura 2) (Santos et al., 2014). A rP21 vem sendo utilizada em vários estudos para elucidar a sua função sobre os aspectos biológicos do *T. cruzi* e sua importância na interação patógeno-hospedeiro (RODRIGUES et al., 2012).

Silva e colaboradores (2009) mostraram que a proteína rP21 aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais por um mecanismo dependente da ligação da proteína ao receptor de quimiocinas CXCR4 (RODRIGUES et al., 2012); por meio dessa ligação a célula induz a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e ativa a via de sinalização celular mediada por via PI3-quinase de forma independente de AKT (SANTOS et al., 2014). A rP21 caracteriza-se por estimular a atividade pró-fagocítica de macrófagos, o que influencia de forma positiva no processo de invasão celular pelo parasito nas células hospedeiras, que são estimuladas a internalizarem o parasito, aumentando o processo de invasão dessas células pelo protozoário (RODRIGUES et al., 2012).

Por possuir uma característica pró-fagocítica a rP21 permite que o parasito se mantenha intracelularmente, onde o mesmo pode romper o compartimento do vacúolo parasitóforo e se replicar livremente dentro do citoplasma da célula hospedeira; em contrapartida, a célula pode retardar a replicação do parasito através da polimerização do citoesqueleto de actina (TEIXEIRA et al., 2017). Para avaliar o papel do citoesqueleto de actina durante a infecção experimental por *T. cruzi*, realizou-se ensaios de invasão infectando macrófagos e mioblastos com tripomastigotas, após 96 horas os mesmos foram tratados com INF- γ ou rP21; foram

realizadas análises de multiplicação parasitária, bem como a análise do citoesqueleto de actina, tanto as células tratadas com IFN- γ quanto com rP21 apresentaram um citoesqueleto mais polimerizado e menor multiplicação intracelular. (MARTINS et al; 2015).

Em um dos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo, tratou-se as células hospedeiras com anticorpos policlonais desenvolvidos contra a rP21 e observou-se a inibição do processo de invasão celular tanto por formas tripomastigotas quanto por amastigotas em ensaios realizados *in vitro*; ainda, com a adição da rP21 em ensaios de invasão com amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos em células HeLa, houve um aumento significativo na invasão celular pelo protozoário, demonstrando que a proteína está envolvida no processo de internalização do parasito (RODRIGUES et al; 2012).

Estudos em que foi avaliado a inflamação crônica em implante de esponjas de poliéster no dorso de camundongos, as esponjas implantadas receberam, a cada 72 horas durante nove dias, concentrações crescentes de tratamentos com rP21 (10 μ g, 40 μ g e 100 μ g), logo após o tratamento os animais foram eutanasiados e as esponjas foram removidas cirurgicamente para análises bioquímicas e histológicas, observou-se o aumento de N-acetilglicosaminidase (NAG), o que aponta que rP21 participa da ativação de macrófagos; já nas concentrações mais altas de rP21 observou-se um aumento significativo na produção de Mieloperoxidase (MPO), que é uma enzima expressa por neutrófilos ativados, o que evidencia a habilidade da rP21 em recrutar células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e neutrófilos (TEIXEIRA et al., 2015). Ainda neste estudo, verificou-se o recrutamento de mastócitos e uma redução relevante no conteúdo de hemoglobina o que demonstra um potencial antiangiogênico da rP21. (TEIXEIRA et al., 2015).

Uma característica relevante foi que, após a administração de rP21, ocorreu um aumento no recrutamento de células do sistema imunológico devido ao seu potencial quimiotático, induzindo alta quimiotaxia de leucócitos em experimentos realizados com lavado peritoneal de camundongos, quando comparados com lavados de animais inoculados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), mantendo um perfil de recrutamento semelhante ao de processos infecciosos; os neutrófilos, que são a primeira linha de defesa do organismo, tiveram sua população mudada geralmente para macrófagos e linfócitos o que caracteriza uma resposta imunológica mais específica (TEIXEIRA et al., 2015). Dessa forma, acredita-se que a produção contínua da P21 pelas formas amastigotas de *T. cruzi*, localizadas no interior de fibras cardíacas para o espaço extracelular, promova o recrutamento de leucócitos e o aumento da produção de IL-4 que é uma citocina que também induz os macrófagos a adquirirem uma ativação alternativa

(M2), caracterizados pelo aumento da produção de sFlt-1, uma molécula antiangiogênica, ou receptor solúvel de moléculas angiogênicas (TEIXEIRA et al., 2016).

A proteína rP21 demonstra possuir diferentes propriedades e características biológicas que beneficiam *T. cruzi* no momento de sua invasão; ela norteia um novo horizonte para novos estudos que poderão trazer benefícios para terapias contra DC e CCC que tenham a P21 como alvo terapêutico. De acordo com Teixeira e colaboradores (2015) as atividades biológicas da rP21 até então descobertas permitem concluir que a permanência do parasito no ambiente intracelular (devido a ação quimiotática e atividade pró-fagocítica) assim como a manutenção de baixo parasitismo nas células infectadas (regulação do citoesqueleto de actina), sugerem que ela desempenhe um papel crucial na interação com células hospedeiras, o que garante ao protozoário a perpetuação da infecção ao longo dos anos, com baixa parasitemia, permitindo a progressão para a fase crônica da doença.

1.5 Interação antigênica do *T. cruzi* com o sistema imunológico do hospedeiro

O reconhecimento do *T. cruzi* pelo sistema imunológico é dependente da ativação da imunidade inata e adaptativa, assim como a identificação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) por receptores Toll-likes (TLR) como TLR-2 e TLR-9, levando à ativação de células T e B, tornando os TLRs um link importante entre imunidade inata e adaptativa (CASTILLO et al., 2017). Contudo, de acordo com Dias e colaboradores (2017) os primeiros sinais da infecção sugerem que o parasito pode estimular as células do hospedeiro por meio de antígenos a produzirem mediadores que desencadeiam uma resposta inflamatória induzida contra o parasito, promovendo uma cascata de eventos como síntese de citocinas e produção de óxido nítrico (NO); porém, a ausência de sinalização via TLRs reduz a ativação de células T CD4⁺ contra *T. cruzi* (GADELHA et al., 2012). Sendo assim, o *T. cruzi* é capaz de minimizar a ativação do sistema imunológico através da liberação de várias moléculas que são capazes de induzir a produção de IL-4 e IL-10 que são citocinas anti-inflamatórias que favorecem a regulação da resposta mediada por células dendríticas, prevenindo o dano imunológico continuado, além de favorecer a diferenciação de linfócitos T imaturos para perfil Th2, os quais através da ativação policlonal de linfócitos B produz imunoglobulinas mantendo uma resposta imune humoral (BRYAN et al., 2010). Essa modulação da resposta imune contra o parasito deve atuar permitindo o estado de latência que ocorre nos pacientes e animais infectados, o que possibilita sua resistência e persistência no hospedeiro (MACHADO et al., 2000).

Os macrófagos são as principais células que atuam contra o parasito, por meio da produção de NOs estimulada por INF- γ produzido inicialmente por células Natural Killer (NK) (JADER et al., 2016). Um papel fundamental durante a infecção por *T. cruzi* é desempenhado pelo INF- γ que aumenta a produção de óxido nítrico por macrófagos, inibindo o desenvolvimento da forma intracelular do protozoário; os linfócitos T CD4⁺ Th1 produzem citocinas como TNF- α , IL-12 e INF- γ que estimulam a expansão clonal de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos o que parece estar diretamente envolvido na proteção sistêmica contra a infecção do parasito, podendo destruir as células parasitadas pelo *T. cruzi* que apresentam antígenos do patógeno via MHC-I (MACHADO et al., 2000). Já estudos recentes confirmam que linfócitos T CD8⁺ citotóxicos agem também indiretamente secretando INF- γ para ativar macrófagos, e diretamente através de perforinas com sua atividade citotóxica, outro fator fundamental pela produção de INF- γ pelas células T CD4⁺ e TCD8⁺ está em desempenhar um fator de depuração de tripomastigotas sanguíneos no fígado (WALKER et al., 2014). Contudo, existe um crescente consenso que, uma resposta imune protetora contra *T. cruzi* requer a ativação de um perfil imune Th1, com estímulos das células T CD8⁺ citotóxicas com uma progressão que também possa modular a resposta para um perfil Th2 na fase cônica da doença (HENRIQUES et al., 2013).

1.6 Modelos de imunização com antígenos recombinantes de *T. cruzi* associados a *Adjuvante de Freund* contra a DC.

O significado da palavra adjuvante tem origem de uma palavra latina *adjuvare* que significa ajudar, auxiliar. (SCHIJS, 2000). São compostos capazes de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antígeno a desenvolver uma resposta imune precoce, elevada e duradoura. Modelos vacinais tem utilizado potentes adjuvantes para melhorar o desempenho de antígenos desenvolvidos a partir de tecnologia de DNA recombinante (KONDURI et al., 2017). Esse modelo de imunização com antígenos associado a adjuvantes vem sendo empregado como veículo para o desenvolvimento de muitas vacinas pré-clínicas e clínicas como ebola, malária, vírus da imunodeficiência símia (SIV) e pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), desenvolvida pelo vírus da imunodeficiência humana HIV dentre outras (NOGUEIRA et al., 2013).

A proposta do trabalho é que o adjuvante completo de Freund associado a proteína recombinante P21 possam atuar em cinco caminhos: (i) imunomodulação por meio da capacidade de modificar a rede de citocinas que deve resultar da regulação do sistema imune como um

todo, mas culminando em uma estimulação da secreção de certas citocinas e inibição de outras; (ii) apresentação trata da capacidade do adjuvante de preservar a integridade do antígeno e apresentá-lo às células imunes efectoras apropriadas e vai conferir benefícios como: maximizar os níveis de anticorpos neutralizantes, interferir na afinidade dos anticorpos e influenciar na duração da resposta imune; (iii) ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, o adjuvante deve facilitar a incorporação ou persistência do antígeno dentro do MHC-I; (iv) liberação ou entrega do antígeno define a capacidade de um adjuvante de liberar o imunógeno para as células efectoras, geralmente as células apresentadoras de antígeno (APCs); (v) efeito depósito que pode proporcionar uma liberação prolongada do antígeno, ou por curto tempo (DEGEN et al., 2003). O adjuvante completo de Freund (ACF - em homenagem a Jules T. Freund (1890-1960) imunologista americano nascido na Hungria) é composto por uma emulsão oleosa em água contendo *Mycobacterium tuberculosis* morta pela ação do calor ou componentes de sua parede celular, já o adjuvante incompleto de Freund (AIF) é similar ao adjuvante completo, sem a adição do *M. tuberculosis*; ambos são efetivos em potencializar a resposta imune humoral e celular contra imunógenos co-administrados (SCHINJS, 2000).

Uma das vantagens de usar proteínas recombinantes, por meio de terapia imunogênica aplicada a vacinas, está na facilidade de manutenção da estratégia de incorporar polipeptídeos antigênicos em uma abordagem de vacina contra a DC, permitindo induzir uma resposta humoral robusta ao antígeno apresentado; surge então a necessidade de compreender a interação desses antígenos com o sistema imunológico, para um projeto racional e melhorado de vacinas, no entanto, a persistência do parasito associada a uma resposta imunológica desequilibrada vem contribuindo na progressão da doença (GUPTA et al., 2015).

Surgem inúmeras evidências da participação desses mecanismos imunes efetores na indução da lesão miocárdica de pacientes chagásicos. (MORILLO et al., 2015). As primeiras tentativas de imunização em camundongos com preparações mais definidas foram baseadas em proteínas purificadas de cultura de parasitas, incluindo cruzipaina, uma proteína de haste paraflagelar, ou antígeno de secreção excretório de tripomastigotas (CERNY et al., 2015). Como já discutido, os resultados de tais vacinas são dependentes da orientação da resposta imune que é induzida (RODRÍGUEZ et al., 2015). Por exemplo, a imunização administrando cruzipaina com Adjuvante de Freund ou alumínio, favorecem a resposta imune em relação a um tipo Th2 e altos níveis de anticorpos, onde observou-se o controle da progressão da infecção na fase crônica da doença. (CERNY et al., 2015).

Atualmente, os estudos se baseiam no uso de proteínas recombinantes de alguns antígenos mais promissores testados, que incluem cruzipaina, GP82 e várias outras proteínas

da superfamília trans-sialidase (TS) e proteína-2 de superfície amastigota (ASP-2) (BONTEMPI et al., 2017). Uma variedade muito limitada de antígenos foi avaliada até agora, e alguns estudos tem focado na identificação de novos antígenos que tenham a capacidade de induzir anticorpos potentes, células T CD4+ mais eficazes, e resposta de citocinas em camundongos que possam conferir uma diminuição na parasitemia na fase aguda da doença, com consequente diminuição dos danos teciduais cardíacos (KONDURI et al., 2017).

Essas medidas associadas podem, portanto, levar alguns antígenos a ter um potencial alvo imunoterapêutico servindo como candidatos a vacinas (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2015). Embora os estudos já mencionados acima apoiem à ideia de uma vacina preventiva contra *T. cruzi*, as vacinas terapêuticas podem controlar a infecção pelo protozoário ainda em curso, sendo de fundamental interesse que os mesmos antígenos e formulações de vacinas possam ser utilizados para uma proteção contra a DC, quanto para a terapia de uma infecção em curso, o que permite torna-la uma ferramenta muito flexível para o controle da doença (BASSO et al., 2016; SEID et al., 2017).

Com isso, existem vários trabalhos envolvendo a busca por novas proteínas e compostos antigênicos capazes de aperfeiçoar o tratamento e diagnóstico da DC, vislumbrando uma melhoria das condições de vida dos pacientes chagásicos que enfrentam complicações severas nos dias atuais (BRYAN et al., 2010; SANTOS et al., 2016).

O estudo da rP21 em modelos de imunização, garante o acesso a uma proteína específica envolvida durante a infecção por *T. cruzi*, sem homologia com nenhuma outra proteína de outra espécie, além de ser secretada constantemente por todas as formas evolutivas do protozoário, e ter um papel crucial no processo de invasão e permanência do parasito na célula hospedeira. Além disso, o processo de obtenção da rP21 é considerado simples e de fácil reprodução em laboratório. O presente estudo buscou esclarecer o envolvimento da proteína recombinante rP21 em um modelo de imunização contra a infecção por *T. cruzi*, ajudando na busca de mecanismos e estratégias imunológicas que promovam uma resposta imune celular e humoral mais efetiva e protetora contra a fibrose do tecido cardíaco, observada em casos de CCC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar diferentes estratégias de imunização com rP21, em camundongos infectados ou não por *T. cruzi*, para compreender a interação dessa proteína com o sistema imunológico, assim como identificar um esquema de imunização que reduz a fibrose causada pela infecção crônica e promova a preservação do tecido cardíaco.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a rP21 a partir de culturas de *E. coli* transformadas e avaliar seu grau de pureza;
- Investigar e comparar diferentes estratégias e esquemas de imunização, utilizando a rP21, em animais infectados ou não por *T. cruzi*;
- Avaliar os efeitos imunogênicos da rP21 por meio da detecção de IgG total, IgG1 e IgG2a contra essa proteína;
- Investigar as alterações nos parâmetros hematológicos e leucocitários após as imunizações;
- Investigar se a imunização contínua induz tolerância imunológica em camundongos, avaliando a produção de anticorpos;
- Avaliar o impacto das imunizações na carga parasitária dos animais infectados por *T. cruzi*;
- Quantificar as áreas do baço e coração dos animais imunizados e posteriormente infectados pelo parasita;
- Avaliar o escore inflamatório nos cortes histológicos do coração dos animais infectados;
- Quantificar colágeno total, colágeno I e III nos cortes histológicos de tecido cardíaco dos animais imunizados e infectados;
- Identificar a estratégia de imunização que mais protegeu o tecido cardíaco contra a fibrose resultante da infecção crônica;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e legais.

Os experimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para a Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com o projeto intitulado: “Estudo do efeito inibitório induzido por peptídeos sintéticos sobre as atividades biológicas da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*”, com o número de protocolo 077/14. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), bloco 2B, sala 200 do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, Uberlândia, MG.

3.2. Animais.

Foram utilizados camundongos machos BALB/c de 6-8 semanas de vida, criados e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU, campus Umuarama. Mantidos sob condições padronizadas de luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) em temperatura controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), livres de patógenos externos não pertencentes ao estudo, com comida e água *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical, após serem anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Syntec) e Cloridrato de Xilazina (Syntec), de acordo com as normas do CONCEA e seguindo prescrições do médico veterinário responsável.

3.3. Purificação da proteína rP21.

Seguindo o protocolo de purificação da proteína rP21 (SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2014), bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21, transfectadas com o plasmídeo pET-28a(+) (Novagen) com o gene que codifica a rP21, foram cultivadas em meio LB líquido, com antibiótico de seleção Kanamicina ($50\mu\text{g/ml}$); inicialmente um pré-inóculo foi mantido sob agitação por 18 horas a 37°C . Em seguida, o pré-inóculo foi diluído 1:50 no mesmo meio e incubado a 37°C com agitação a 150 rpm até atingir a densidade óptica (OD) de aproximadamente 0,5 a 0,9 aferida pelo espectrofotômetro (ABS 600nm). Logo após, foi adicionado 1mM de *Isopropyl β -D-l-thiogalactopyranoside* (IPTG), com o objetivo de induzir a síntese proteica; após 3 horas de incubação, todo o volume do meio de cultura foi distribuídos em frascos especiais e centrifugados a 10.000 rpm (Sorvall RC-5C Plus High-Speed-

Centrifuge) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi autoclavado e desprezado, e o pellet foi ressuspendido com PBS, 1,3M, pH 7,2. O volume de cada tubo foi reunido num béquer pequeno de 50 ml, acrescido de lisozima (50 mg/ml), para promover lise da parede celular bacteriana, em seguida utilizou-se um aparelho Sonicador Branson Sonifier 450, o qual promoveu a sonicação do extrato bacteriano durante 20 ciclos de um minuto com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado foi centrifugado a 20200xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em solução de ureia 6M (Amresco 0378).

A proteína recombinante rP21 possui uma cauda de histidina, proteínas que possuem caudas de histidina podem ser purificadas facilmente através de protocolos relativamente simples utilizando cromatografia de afinidade, como por exemplo, coluna de níquel. A amostra foi incubada com resina de níquel, por 2 horas, sob agitação, a 4°C. Após três lavagens em *Binding Buffer* (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), a resina foi lavada novamente três vezes com *Washing Buffer*, tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris- HCl 20 mM, pH 8,0, ureia 6M) e eluída quatro vezes com tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 50mM, Tris-HCL 20mM pH8,0 ureia 6M), contendo concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M, respectivamente) para competir com a cauda de histidina, presente na rP21, pela coluna de níquel e liberar a proteína recombinante purificada.

Todo o volume eluído foi dialisado contra tampão PBS com uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/Por 131198) por 48 horas sob agitação continua a 4°C, para a purificação da proteína, remoção resíduos de ureia e promover o renovelamento proteico, com reposição da solução de PBS 1X após as primeiras 24 hrs de diálise (Figura 2).

Após a diálise a amostra purificada foi aplicada em gel de eletroforese, a 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970), em condições desnaturantes; o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue para confirmação da sua presença, pureza e a concentração da proteína foi quantificado utilizando Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (280nm). Como marcador de peso molecular de proteínas (PM), foi utilizado o PS-101 (Jena Bioscience GmbH). É um marcador composto de uma mistura de sete proteínas purificadas (β - galactosidase 116kDa, Fosforilase B 97,4kDa, Soro Albumina Bovina 66,2 kDa, Álcool Desidrogenase 37,6kDa, Anidrase Carbonica 28,5kDa, Mioglobulina 18,4kDa e Lisozima 14kDa) fornecidas em tampão de carga de gel para aplicação direta em um gel SDS-poliacrilamida. Em seguida, uma imagem do gel foi escaneada no scanner HP Scanjet G4050 através da inversão de cores pelo programa HP Photosmart Premier. Como controle do experimento foi utilizado um marcador de peso molecular de proteínas (PM), PS-101 (Jena Bioscience GmbH).

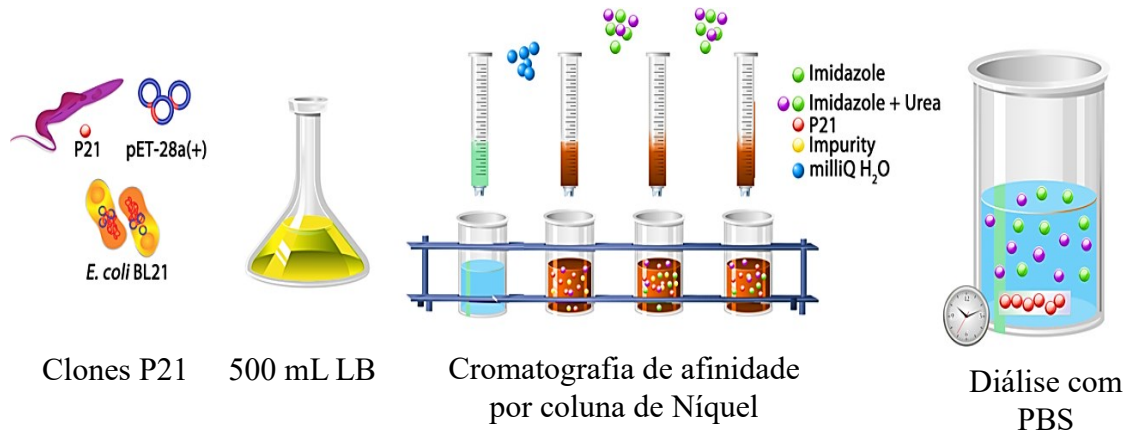


Figura 2 - Esquema do protocolo de purificação da proteína rP21 por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A proteína rP21 é obtida a partir de culturas de *E. coli* transformadas; as bactérias foram crescidas em meio LB, lisadas, centrifugadas e os corpos de inclusão (pellet) foram incubados em coluna de níquel. A coluna foi lavada com tampões contendo concentrações crescentes de imidazol, a rP21 foi eluída e dialisada por 48 horas contra tampão PBS para promover o renovelamento da proteína. Fonte: dissertação de mestrado de Marlus Alves dos Santos (UFU).

3.4. Imunização com rP21 em camundongos saudáveis.

Os camundongos foram imunizados com rP21 para avaliar a produção de anticorpos policlonais IgG total anti-rP21. Antes da imunização, os animais foram distribuídos de forma randômica entre as gaiolas e divididos entre quatro grupos contendo 5 animais cada. A rP21 foi diluída em PBS e foram realizadas três imunizações com intervalos de seis dias entre cada uma, por via subcutânea de acordo com a **Tabela 1**. Os grupos foram divididos como descrito a seguir:

- Grupo 1: controle, os animais foram tratados somente com 200 µl de PBS;
- Grupo 2: rP21 0,5 µg, os animais foram tratados com 200 µl de PBS + 0,5 µg de proteína rP21 por animal;
- Grupo 3: rP21 1 µg, os animais foram tratados com 200 µl de PBS + 1 µg de proteína por animal;
- Grupo 4: rP21 10 µg, os animais foram tratados com 200 µl de PBS + 10 µg de rP21 por animal;

No terceiro dia após cada imunização as amostras de sangue foram coletadas via plexo orbital, com prévia administração de um colírio anestésico (Cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%), sendo administrada uma gota por orbita ocular; as amostras foram coletadas utilizando capilares de vidro contendo heparina, armazenadas em microtubos (Eppendorf®) de 1,5 mL e centrifugadas 720 x g por 10 minutos para a obtenção do soro sanguíneo que foram acondicionados novamente em microtubos e congeladas a -20°C.

Tabela 1 – Protocolo de imunização dos animais com rP21

Grupos	Dias	Coleta de sangue	Veículo + Antígeno	Via
PBS	1	3	PBS 200µl	Subcutânea
	7	9		
	14	17		
0,5µg	1	3	PBS 200µl + rP21 0,5µg/animal	Subcutânea
	7	9		
	14	17		
1µg	1	3	PBS 200µl + rP21 1 µg/animal	Subcutânea
	7	9		
	14	17		
10µg	1	3	PBS 200µl + rP21 10 µg/animal	Subcutânea
	7	9		
	14	17		

3.5 Parâmetros hematológicos

No vigésimo primeiro dia, após aplicação dos anestésicos (via intraperitoneal) prescritos pelo médico veterinário do CBEA, o animal foi submetido à punção cardíaca com sangria total e as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos estéreis contendo 0,1 mL de solução a 10 % de EDTA (tripotassic EDTA) para a realização dos hemogramas. O hemograma, leucograma e plaquetograma foram realizados em analisador automático de hematologia para uso veterinários (pocH – 100iVDiff®), previamente aferido com sangue controle. A contagem diferencial ou específica de leucócitos foi realizada em lâminas com esfregaços sanguíneos corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (FERREIRA NETO et al., 1982); os parâmetros hematológicos e leucocitários foram comparados com os valores de referência (PESSOA, 2007; MCKEON et al., 2011).

3.6. Ensaio de tolerância a rP21 em camundongos saudáveis.

Os camundongos foram tratados (N= 10) durante vinte e um dias consecutivos com 10 µg de rP21/animal. No 3º, 9º, 14º e 21º dia após cada imunização amostras de sangue foram coletadas via plexo orbital e armazenadas (como descrito) e a tolerância imunológica, que consiste na ausência de responsividade a antígenos que estão constantemente em contato com o sistema imunológico, foi analisada. As amostras foram centrifugadas a 720 x g por 10 minutos para a obtenção do soro sanguíneo, acondicionadas em microtubos e congeladas a -20°C.

3.7. Pesquisa de anticorpos IgG total anti-rP21 no soro

A titulação dos anticorpos anti-rP21 no soro dos animais foi realizada pelo teste ELISA indireto, com modificações (GONÇALVES et al., 2012). Ensaios preliminares foram realizados para otimizar as condições da reação. Foram testadas diferentes concentrações de proteína recombinante rP21 (40, 30, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,62 µg/poço) em tampão carbonato-bicarbonato, 0,06M, pH 9,6 para sensibilizar as placas e em diferentes tempos (120, 90, 60 e 45 minutos) de incubação das amostras com os anticorpos.

Após as devidas padronizações, a cinética de detecção da proteína pelo soro anti-rP21 foi realizada em placas de microtitulação de alta afinidade, sensibilizadas com 5 µg/poço de rP21 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween (PBS-T), 1, 3M, pH 7,2, por 5 minutos. Após a lavagem foi realizado o bloqueio dos poços com tampão *Assay Diluent* contendo PBS e soro bovino fetal 10% durante uma hora em temperatura ambiente. Como controle positivo foi utilizado soro de camundongos previamente imunizados com rP21 na diluição de 1:200 em PBS com triplicata de 25 µl/poço (SANTOS et al., 2014); como controle negativo foi utilizado soro de camundongos não imunizados, 25 µl/poço, em triplicata. As amostras foram aplicadas nas placas, 25 µl/poço, juntamente com os referidos controles, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C, sendo lavadas 5 vezes, como descrito anteriormente, com PBS-Tween, incubadas com 50 µl de soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com enzima *horseradish peroxidase* (HRP) (1:2500), diluídos em PBS com 10% de SFB, por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas novamente sete vezes e reveladas pelo substrato *Tetramethylbenzidine* (TMB) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany), após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 25 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2N. A OD foi determinada em leitor ELISA (GloMax Explorer System Promega), a 450 nm. Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: IE = OD da amostra/*cut off*, onde *cut-off* foi estabelecido como a média de OD

de três controles negativos acrescida de dois desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quanto Índice ELISA > 1 .

IE = OD da amostra

Cut-off

3.8. Células e parasitas

Células Vero, fibroblasto de rim de macaco verde da África, foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, GIBCO-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD), suplementado com L-glutamina (2mM), D-glicose(4500mg/L), bicarbonato de sódio (200mg/ml), HEPES (2380mg/ml), piruvato de sódio (100mg/ml), penicilina (60mg/L), gentamicina (40mg/L) estreptomicina (10mg/L) e 10% de soro bovino fetal (SFB-Vitrocell/Embriolife). As células foram mantidas em garrafas de cultura estéreis de 75 cm², acondicionadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. As culturas foram conferidas diariamente e o meio substituído sempre que necessário. Foram usadas formas tripomastigotas de cultura de tecidos (TCT), da cepa Y de *T. cruzi* em ensaios *in vivo*.

3.9. Imunização com rP21 e Adjuvante de Freund

Os camundongos foram divididos em cinco grupos contendo 6 animais cada e tratados como descrito a seguir:

- Grupo 1: é o grupo controle, recebeu 200 µl de PBS semanalmente por via subcutânea durante três semanas;
- Grupo 2: os animais foram imunizados semanalmente com albumina de soro bovino (BSA), 10 µg/animal, diluídos em 100 µl de PBS e 100 µl de adjuvante de Freund;
- Grupo 3: os animais foram imunizados semanalmente com 10 µg de rP21/animal, diluída em 100µl de PBS e 100 µl de adjuvante de Freund;
- Grupo 4: os animais foram imunizados semanalmente com 10 µg de rP21/animal, diluída em 200µl de PBS;
- Grupo 5: os animais foram imunizados com 10 µg de rP21/animal, diluída em 200µl de PBS, durante 21 dias consecutivos.

Cabe ressaltar, que nos casos em que foi utilizado o adjuvante de Freund, a primeira imunização (1a dose), empregou-se o adjuvante completo, nas imunizações posteriores (2a e 3a dose) empregou-se o adjuvante incompleto, sendo que as doses foram administradas na mesma concentração, volume e via. A Tabela 2, a seguir, resume a estratégia de imunização empregada.

Tabela 2 – Protocolo de imunização dos animais com rP21 e adjuvante de Freund

Grupos	Dias	Antígeno µg/Animal	Veículo	Via
Controle	1	-	PBS	Subcutânea
	7	-	PBS	Subcutânea
	14	-	PBS	Subcutânea
Adj-BSA	1	10	Adjuvante completo de Freund	Subcutânea
	7	10	Adjuvante incompleto de Freund	Subcutânea
	14	10	Adjuvante incompleto de Freund	Subcutânea
Adj-rP21	1	10	Adjuvante completo de Freund	Subcutânea
	7	10	Adjuvante incompleto de Freund	Subcutânea
	14	10	Adjuvante incompleto de Freund	Subcutânea
PBS-rP21	1	10	PBS	Subcutânea
	7	10	PBS	Subcutânea
	14	10	PBS	Subcutânea
rP21-21d	21	10	PBS +	Subcutânea

3.10. Ensaio de invasão *in vivo*

No vigésimo primeiro dia após a primeira imunização, os animais foram desafiados com formas TCT da cepa Y de *T. cruzi* na quantidade de 10^4 parasitas por animal. Foi usado uma seringa de 1 mL bico slip acoplada a uma agulha 13X4,5 (BD), foram inoculados 100µl/animal da suspensão de parasitos, diluídos em PBS por via subcutânea. Após 90 dias de infecção, os animais foram anestesiados como descrito e submetidos à punção cardíaca para coleta das

amostras de sangue, as quais foram centrifugadas, o soro coletado e armazenado a -20°C até o momento da análise.

3.11. Parasitemia

A parasitemia dos camundongos infectados foi determinada por meio do protocolo descrito por (JORGE; CASTRO, 2000). Após 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 e 27 dias após a infecção os animais infectados foram colocados em uma caixa de retenção, com a cauda para fora; com uma das mãos a cauda foi massageada no sentido da base para ponta, com a tesoura na outra mão, cortou-se 1 mm ou menos da ponta da cauda, deixando o sangue correr formando uma gota, com uma micropipeta com ponteira coletou-se 5 μl de sangue, esse volume foi aplicado sobre uma lâmina de vidro, imediatamente recobrimos a gota com uma lamínula 18x18 mm, deixando o sangue espalhar naturalmente sem qualquer pressão; levou-se as lâminas ao microscópio óptico, sob a objetiva de 40X, e o número de parasitas móveis foi determinado percorrendo toda a área da lamínula. Os parasitos foram quantificados em número de parasitos/5 μl de sangue, observados por toda a área da lamínula, para posterior comparação e avaliação da importância da imunização com rP21 no curso da fase aguda na infecção por *T. cruzi*.

3.12. Coleta de órgãos e análise macroscópica

Após 90 dias de infecção, os camundongos foram anestesiados como descrito, eutanasiados por deslocamento cervical e submetidos à necropsia para remoção do coração e baço; foram obtidas imagens dos órgãos, utilizando uma câmera digital de 13 megapixels, para fins de avaliação morfométrica, em que as condições de luminosidade e altura da câmera foram padronizadas, uma régua graduada em centímetros e milímetros foi incluída em todas as imagens como referência. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ. O coração dos camundongos foram seccionados e congelados a -80°C para posterior extração de DNA, para determinação da carga parasitária por qPCR e análise histológica.

3.13. Extração de DNA

Para extração de DNA do tecido cardíaco foi utilizado o PureLink® Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As

concentrações e a qualidade do DNA foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) e amostras com pureza ideal (~1,8) foram selecionadas.

3.14. Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

As amostras de DNA extraídos do coração foram submetidas à reação de qPCR que consistiu em 10 mM Tris-HCl pH 8,1 5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmols de cada iniciador; P21fw (5'-AACGCCACCATCAATCTTTTG-3'), P21rv (5'-CGTCGCCATTCTCATTCTTC-3') que resulta na amplificação de fragmento de 65 pares de base *T. cruzi*, 1,25 U de Taq Platinum (Invitrogen). Para as reações de qPCR, com um volume de 25 µl, foram adicionados 4 µl (~50 ng) de DNA extraído e 0,4 µl de cada iniciador. Foi realizado o uso do reagente SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), contendo SYBR® Green Dye AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTPs com dUTP, Rox referência passiva, tampão com componentes otimizados. As reações foram realizadas na plataforma ABI7300 (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 45 segundos e 72°C durante 30 segundos. Após o alongamento final, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50°C a 95°C, com aumento gradual de 0,5°C/s para se obter a temperatura de *melting* e produtos não específicos.

Para quantificação da carga parasitária, primeiramente foi definida uma curva padrão com diluições em série a partir de DNA extraído de 10⁸ parasitos/ml de *T. cruzi* juntamente com 50 mg de tecido de coração de camundongo não infectado (correspondendo a uma diluição de 2x10⁵ a 2x10⁰ parasitos por ensaio). Para cada reação, o software SDS 7300 (Applied Biosystems) procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou e forneceu o coeficiente de regressão linear (R²) e o *Slope* (inclinação da curva). O R² mede quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de *cycle threshold* (CT) das amostras padrão. O *Slope* indica a eficiência da amplificação para o ensaio (um valor de 3,32 representa 100% de eficiência).

3.16. Inclusão na parafina.

Os órgãos coletados foram fixados em formaldeído 4% e incluídos em parafina. Inicialmente foi realizada desidratação do tecido em gradação com álcool etílico (70%, 85%,

95% e 100%). A inclusão em parafina foi precedida com o xilol, para remoção do álcool, uma bateria de três vezes de infiltração em parafina líquida, mantida em estufa a 56°C (ponto de fusão) e posteriormente o mesmo foi transferido para o molde (bloco) contendo parafina líquida e aguardado 24 horas para endurecimento da parafina. Os blocos foram levados para microtomia e para a obtenção das secções com 4 µm de espessura, que foram então coletadas em lâminas de vidro. Essas lâminas contendo os cortes foram processadas para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e coloração por Picrosirius Red.

3.17. Análise histopatológica.

Os animais infectados foram analisados quanto ao perfil histopatológico do tecido do coração. Para a avaliação qualitativa da resposta inflamatória, os cortes foram desparafinizados e corados com HE. Observou-se o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório nos cortes histológicos do coração em todos os animais dos grupos em (duplicata). O tipo de severidade do infiltrado inflamatório foram determinados pela ausência ou presença de: (i) reação inflamatória, (ii) linfócitos, (iii) macrófagos, (iv) neutrófilos, (v) plasmócitos e (vi) necrose. Essas características foram avaliadas por intensidade: (-) ausente, (+) leve, (+ +) moderada e (+ + +) intensa. Embora a análise ter sido realizada por animal, o resultado foi determinado pela média de cada grupo.

As análises foram avaliadas com objetiva de 40X de aumento, em ensaio duplo cego independente. O estudo foi feito por um médico patologista e professor Dr. Henrique Borges da Silva (CRM: 36087). As análises foram feitas no Laboratório de Anatomia Patológica (Lapat), localizado no Hospital das Clínicas da UFU (HC-UFU), o especialista não teve acesso ao design e nem os dados da pesquisa, para manter a veracidade dos dados sem manipulação, por envolver uma análise qualitativa e subjetiva.

3.18. Coloração com *Picrosirius Red*

Para avaliar o impacto das imunizações utilizando rP21 na fibrose presente no coração dos animais infectados, foi realizada uma análise morfométrica da área de colágeno total, bem como colágenos dos tipos I e III. Os cortes foram submetidos à coloração em *Picrosirius Red*, que permite a distinção das fibras de colágeno depositadas no tecido (KYLE et al., 2017). O estudo foi feito avaliando área de colágeno (µm) micrometros por 10 campos microscópicos de

cada órgão, o que pode indicar as alterações na composição do tecido da matriz extracelular, fibrose, necrose tecidual e até carcinomas epiteliais.

A quantificação de colágeno total foi feita utilizando um microscópio Aperio Scan Scope®AT Turbo. Para a análise morfométrica da área de colágeno I e III, foi utilizado um microscópio invertido de fluorescência *Nikon Eclipse TiS* com luz polarizada acoplada ao analisador de imagem digital para a quantificação da área por diferença de cor. Nesse sistema, o grau de birrefringência das fibras colágenas é avaliado através da intensidade de cor, no qual se delimita as faixas de espectros correspondentes à coloração de colágeno I e III. Sendo assim, as fibras colágenas do tipo I emitem cor vermelha e as fibras colágenas do tipo III emitem cor verde, sendo que a sobreposição das cores gera a cor amarela/alaranjada. As fotomicrografias foram obtidas a partir da delimitação do corte histológico em quatro partes, evitando locais com presença de artérias, arteríolas e veias que são regiões ricas em colágeno, foram então obtidos 10 campos aleatórios de cada corte no aumento de 20X, mantendo os mesmos parâmetros de luminosidade do microscópio para todas as imagens, totalizando 60 fotomicrografias por grupo, totalizando 300 fotomicrografias por órgão para colágeno I e III.

Para a quantificação de colágeno total, as fotomicrografias seguiram os mesmos parâmetros, delimitou-se o corte histológico do coração em quatro partes, evitando locais com presença de artérias, arteríolas e veias que são regiões ricas em colágeno, foram obtidos 10 campos aleatórios de cada corte no aumento de 40X, mantendo os mesmos parâmetros de luminosidade do microscópio para todas as imagens, totalizando 60 fotomicrografias por grupo e 600 fotomicrografias para colágeno total, I e III.

As fotomicrografias foram analisadas pelo software ImageJ, após calibração por meio de uma fotomicrografia capturada nas mesmas condições que as outras contendo uma escala através da opção Analyze → Set Scale → Distance in pixels (já estabelecida pelo programa) → Known distance (100µm) → Pixel aspect ratio (1.0) → Unit of length (µm) → Global → OK. A área de colágeno I e a área de colágeno III foi dada em (µm²/campo) em cada foto. Este programa relaciona a área do tecido que foram preenchidos pelo colágeno tipo I e tipo III após coloração com *Picrosirius Red*. Após a calibração, as fotomicrografias selecionadas foram submetidas a análises individuais para colágeno tipo I e tipo III (Image → Color → Split Channel), separando as imagens em três canais: vermelho, verde e azul; o canal azul foi desconsiderado, sendo assim, a análise para colágeno do tipo I foi feita pelo canal vermelho e a análise de colágeno do tipo III foi feita pelo canal verde. Posteriormente, a análise foi mensurada por Image → Adjust → Color Threshold para ajustar as imagens de cada grupo em

um mesmo padrão. Os resultados foram plotados no software GraphPad Prism 6.0, para análises estatísticas não paramétricas (Dunn's Multiple Comparison).

3.19. Ensaio de titulação de anticorpos anti-rP21 IgG total, IgG1 e IgG2a no soro dos animais infectados.

Conforme a padronização já descrita anteriormente, a cinética de detecção da proteína pelo soro anti-rP21 IgG total, IgG1 e IgG2a pelo teste ELISA foi realizada em placas de microtitulação de alta afinidade, sensibilizadas com 5 µg/poço de rP21 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6, por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), 1,3M, pH 7,2. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo Tween 20 a 0,05%(PBS-T) acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) durante 1 hora em temperatura ambiente. 25 µL das amostras de soro foram incubadas por 2 horas para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-rP21. Conjugados específicos para cada classe de imunoglobulina anti-IgG (1:1000) de camundongos marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) diluídas em PBS-Ta 1%, anti-IgG1 (Novus Biological, 1:4000) e anti-IgG2a (Catalag Lab. Inc., South San Francisco, EUA 1: 2000) de camundongo marcado com biotina, diluídos em PBS-T+BSA1%, foram adicionados e incubados por 1 hora a 37 °C. Para detecção de IgG1 e IgG2a, placas foram incubadas com estreptoavidina/peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) por 30 min a temperatura ambiente. Entre cada etapa da reação, as placas foram lavadas com PBS-T por seis vezes. A reação foi desenvolvida com 2,2-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônica) (ABTS, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, Washinto, DC, EUA) e a densidade óptica (DO) determinada a 405 nm em leitor de placas (SpectraMax M2e Molecular Device, EUA) (SILVA et al., 2007). Foram utilizados como controle, soro de camundongo imunizados com rP21 como controle positivo (SANTOS et al., 2014) e soro pré-imune de camundongos como controle negativo, diluídos em PBS, em triplicata.

3.20. Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos *in vitro* e *in vivo*, envolvendo manuseio de parasitos, cultivo de células infectadas, animais e reagentes, bem como utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

3.21. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A comparação de dados entre os grupos infectados com o grupo controle PBS foi analisada pelo teste T não pareado de Student, *two-way* e *one-way* ANOVA; o teste de Tukey (paramétrico) ou o teste de Dunn (não paramétrico) foram utilizados para análise de comparação múltipla entre os grupos estudados, de acordo com o delineamento experimental. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação, determinação da pureza e concentração da rP21

Para confirmar o sucesso na obtenção e purificação da rP21 que foi utilizada nos ensaios, assim como assegurar que a proteína purificada esteja livre de contaminantes que possam influenciar os resultados, após a etapa de diálise descrita no protocolo de purificação (SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2014), a amostra dialisada foi submetida a eletroforese em gel poliacrilamida (Figura 3). No poço aplicado com a solução da rP21 podemos observar a presença de uma única e forte banda proteica próximo a 18kDa, indicando a pureza da amostra rP21 obtida.

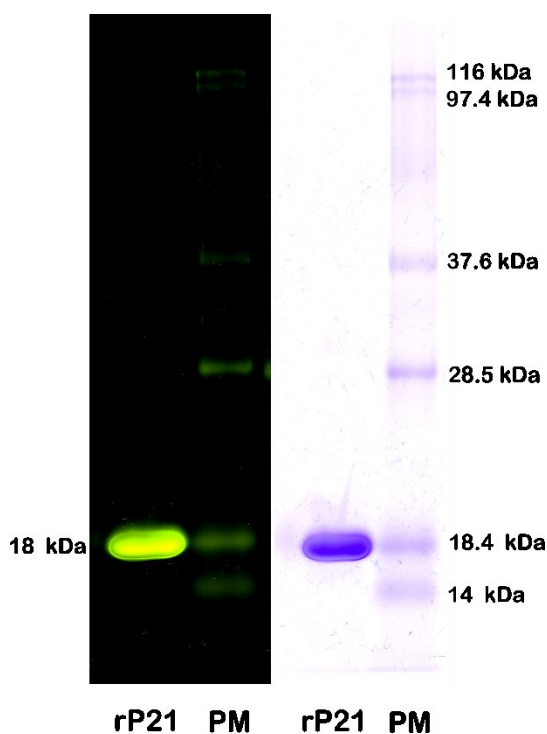


Figura 3 – Gel de SDS-PAGE da rP21, obtenção e avaliação da pureza. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% para confirmar a obtenção rP21 utilizada nos ensaios; A imagem foi obtida por meio de um escâner de gel de eletroforese com inversão de cores pelo software do programa HP Photosmart Premier.

4.2 A rP21 tem a capacidade de induzir uma resposta imune humoral com produção de anticorpos IgG total anti-rP21

Para se avaliar o perfil imunogênico da proteína rP21, camundongos foram imunizados com a proteína, verificou-se por ELISA que a rP21 induziu resposta imunológica confirmada pela produção de IgG total anti-rP21 presente no soro dos animais imunizados com a proteína, os quais apresentaram reatividade a partir da terceira semana de imunização.

Ao comparar os níveis de anticorpos induzidos pela imunização com rP21 entre os grupos estudados o maior título foi observado no grupo de animais imunizados com 10 µg/animal com IE= 1,58 (Figura 4 C). Entretanto, a detecção de anticorpos ocorreu de forma mais discreta nos grupos; 1 µg/animal (IE=1,34); 0,5 µg/animal (IE=1,17).

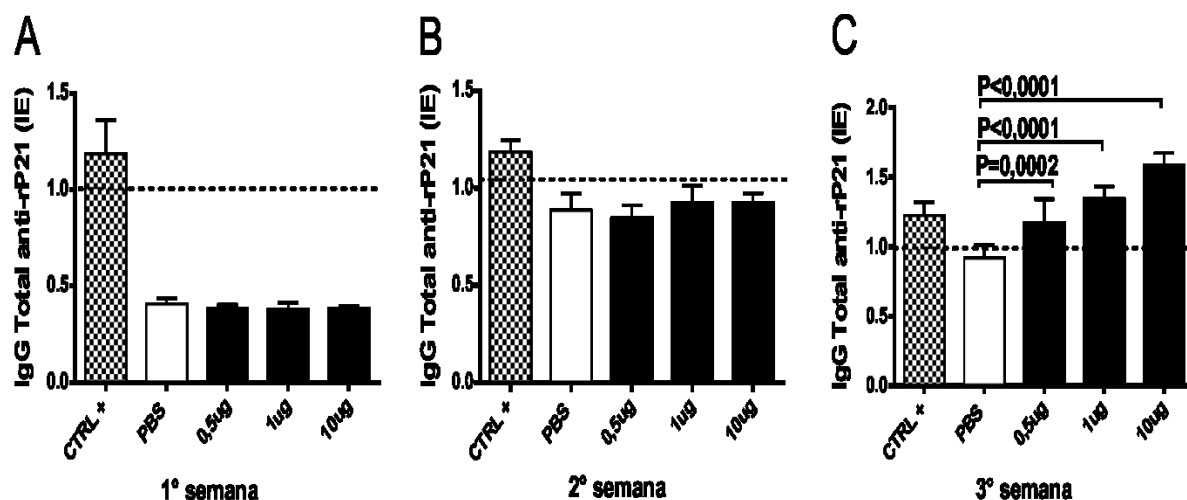


Figura 4 - Detecção de anticorpos IgG total anti-rP21 durante três semanas de imunizações com rP21. Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos (N = 5 animais por grupo) imunizados semanalmente durante três semanas com rP21. Soro de animais previamente imunizados com rP21, na diluição de 1:200 foi usado como CTRL +. O grupo controle negativo foi tratado apenas com 200µl de PBS por animal. Avaliou-se a produção de anticorpos rP21 em relação ao grupo controle negativo. (A) 1º semana (B) 2º semana (C) 3º semana. Os dados em A-C correspondem à média das triplicatas por cada grupo estudado \pm DP, foram analisados com teste t de Student Kruskal-Wallis (one-way ANOVA). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Com os valores de P representados no gráfico.

4.3 Animais imunizados com rP21 apresentou número maior de linfócitos circulantes na corrente sanguínea

Para analisar se as imunizações induziam alterações nos parâmetros hematológicos dos animais após 21 dias, as amostras de sangue foram obtidas e processadas. Os resultados indicam alterações consideráveis como aumento dos níveis de hemoglobina no grupo imunizado com 10µg/animal, quando comparadas ao grupo controle PBS; os valores de hemoglobina e consequentemente o hematócrito estavam acima dos valores de referência no grupo 10 µg/animal. Os outros parâmetros hematológicos dos grupos estudados estavam dentro da normalidade quando comparados com os valores de referência, sendo assim, conclui-se que os resultados não indicam a presença de anemia nos animais imunizados com rP21. Já no leucograma, foi observada uma linfócitose no grupo 10 µg/animal ao fim do processo de imunização quando comparados ao controle, além de uma neutrófilia no grupo 0,5 µg/animal; pode-se inferir que a imunização foi reconhecida pelo sistema imunológico, aumentando os índices de linfócitos no grupo 10 µg/animal e de neutrófilos no grupo 0,5 µg/animal circulantes na corrente sanguínea. Os resultados obtidos na Tabela 3 correspondem a média das triplicatas \pm DP dos grupos avaliados, que foram analisados com teste t de Student Kruskal-Wallis (test

one-way ANOVA), considerados significativos quando $P < 0,05$, com os valores representados na tabela com “*”.

Tabela 3 - Valores de referência para camundongos BALB/c (SANTOS, et. al 2016).

PARÂMETROS	TRATAMENTOS C/ P21				
	Valores de Referência	Controle PBS	0,5 µg	1 µg	10 µg
Eritrócito ($10^6/\text{mm}^3$)	7,1 a 9,5	$10,05 \pm 0,5$	$9,9 \pm 0,4$	$10,2 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,4$
Hemoglobina (g/dL)	11,6 a 15,8	$14,1 \pm 3,6$	$15,8 \pm 0,7$	$15,9 \pm 0,4$	$17,1 \pm 0,8^*$
Hematócrito (%)	37,4 a 51,7	$50,5 \pm 2,5$	$50,8 \pm 2,0$	$51,6 \pm 0,8$	$55,7 \pm 1,7^*$
VCM (fL)	41,5 a 57,4	$50,2 \pm 0,9$	$50,7 \pm 0,8$	$50,1 \pm 0,4$	$50,5 \pm 0,7$
HCM(pg)	14,1 a 18,4	$15,7 \pm 0,2$	$15,8 \pm 0,1$	$15,5 \pm 0,1$	$15,6 \pm 0,2$
CHCM (g/dL)	30,5 a 34,2	$31,5 \pm 0,7$	$31,2 \pm 0,6$	$31,06 \pm 0,3$	$30,9 \pm 0,3$
Leucócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	1,5 a 4,8	$8,6 \pm 1,4$	$6,5 \pm 0,6$	$7,5 \pm 1,2$	$8 \pm 0,8$
Mielócitos (%)	0	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$
Metamielócitos (%)	0	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$
Neutrófilos (%)	11 a 29	$15,8 \pm 3,8$	$27,5 \pm 3,8^*$	$19,7 \pm 4,9$	$14,25 \pm 3,8$
Eosinófilos (%)	0 a 5	$1 \pm 2,4$	$0 \pm 0,0$	$2 \pm 1,8$	$1,1 \pm 1,8$
Basófilos (%)	0 a 1	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$
Monócitos (%)	0 a 6	$1,3 \pm 2,3$	$2,1 \pm 2,1$	$1,5 \pm 1,8$	$0,6 \pm 0,7$
Linfócitos (%)	65 a 87	$78,8 \pm 7,1$	$72,4 \pm 4,5$	$78,7 \pm 4,8$	$85,2 \pm 3,38^*$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	325 a 888	$1.121 \pm 20,3$	$1,374 \pm 74,2$	$1.386 \pm 20,2$	$1.056 \pm 24,3$

*Análise estatística ANOVA, $p < 0,05$, quando comparados com controle

4.4 A rP21 não gera tolerância imunológica e sua afinidade antígeno-anticorpo mantém a titulação até 1:32.

Para investigar o desenvolvimento de tolerância ao antígeno estudado nos animais imunizados com rP21, optou-se por tratar os camundongos com a dosagem de 10 µg/animal, a qual apresentou mais reatividade nos ensaios anteriores. Os camundongos foram imunizados durante 21 dias consecutivos com a proteína rP21, e as amostras de sangue foram coletadas e analisadas para dosagem de IgG total anti-rP21. Os resultados mostram que, a partir da segunda semana, houve a detecção de anticorpos no soro dos animais imunizados com rP21 no nono dia com IE=2,0, no décimo quarto dia com IE=1,8 e vigésimo primeiro com IE=1,6; indicando que mesmo os animais sendo imunizados durante 21 dias ininterruptos o sistema imunológico reagem produzindo anticorpos continuamente, mostrando que a rP21 é um imunógeno capaz de estimular uma imunidade específica sem gerar tolerância (**Figura 5A**). Para avaliar o grau de afinidade estabelecida pela força de reação entre a rP21 e o anticorpos produzidos, identificou-se a amostra da semana que mais apresentou reatividade contra a proteína e procedeu-se uma diluição seriada; e os resultados mostram que os anticorpos das amostras obtidas no nono dia possuem afinidade considerável pela proteína rP21 até a diluição de 1:32 que tiveram suas absorbâncias mantidas acima do (IE>1) o que aponta que a proteína tem uma afinidade antígeno-anticorpo forte com titulação até 1:32 (**Figura 5 B**).

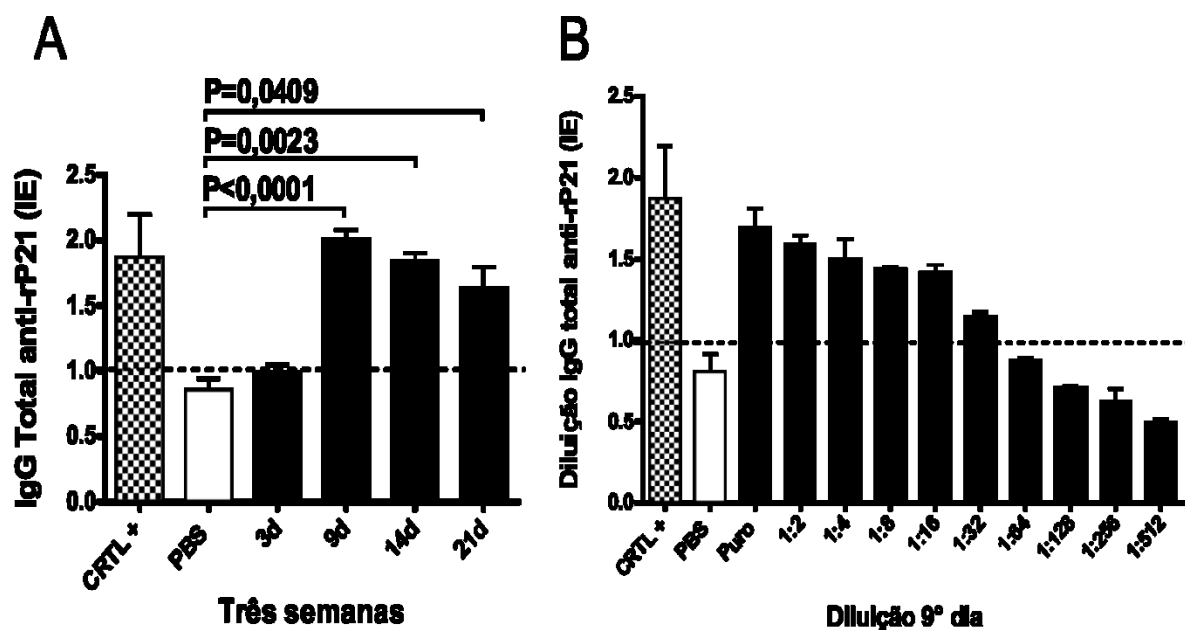


Figura 5 - A proteína rP21 não gera tolerância e sua afinidade antígeno-anticorpo apresenta ligações fortes e duradouras. Os camundongos foram imunizados durante vinte e um dias consecutivos com 10µg/animal da proteína rP21 diluída em 200µl de PBS por via subcutânea. **(A)** O sangue dos animais foi colhido nos dias 3, 9, 14 e 21 para detecção de anticorpos IgG total anti-rP21. **(B)** Foi realizada uma diluição seriada com o soro dos animais do nono dia e a proteína rP21 apresentou alta afinidade pelo anticorpo e estabelece ligações ao antígeno com IE > 1 até a diluição de 1:32. O CTRL - foi obtido a partir de soro de camundongos não imunizados e tratados somente com PBS, já o CTRL + utilizou-se soro de camundongos previamente imunizados com rP21 + Adjuvante Freund. Os dados em A e B correspondem à média das triplicatas por cada grupo estudado \pm DP, foram analisados com teste t de Student (Kruskal-Wallis one-way ANOVA). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Como os valores de P representados no gráfico.

4.5 A imunização com rP21 favoreceu a diminuição do número de parasitas no sangue de animais infectados por *T. cruzi*

Para investigar se a imunização com rP21 influenciaria positivamente no controle da parasitemia de animais infectados por *T. cruzi* foram realizados ensaios *in vivo* tendo em vista quantificar o número de parasitos presentes na corrente sanguínea. Os grupos Adj-rP21 e rP21-21d apresentou ao 9º dia menor número de parasitas no sangue quando comparados ao grupo PBS ao Adj-rP21 com ($P=0,0344$) e ao rP21-21d com ($P=0,0114$). Ao 11º dia o grupo rP21-21d se destacou por apresentar um declínio maior no número de parasitos com ($P<0,0001$), da mesma forma ocorreu com o grupo PBS-rP21 que também manteve o número de parasitos menor quando comparados ao grupo PBS com ($P<0,0001$), em contrapartida, o grupo Adj-rP21 ao 11º dia apresentou número de parasitos mais elevados quando comparados ao grupo PBS com ($P=0,0016$). A partir do 13º dia houve uma redução no pico de parasitemia em todos os grupos estudados e o grupo PBS ao 17º apresentou um maior número de parasitos na corrente sanguínea quando comparado com o grupo Adj-rP21 com ($P=0,0156$). Sendo

assim, o processo de imunização com rP21, favoreceu a diminuição do número de parasitos no sangue nos primeiros dias de infecção.

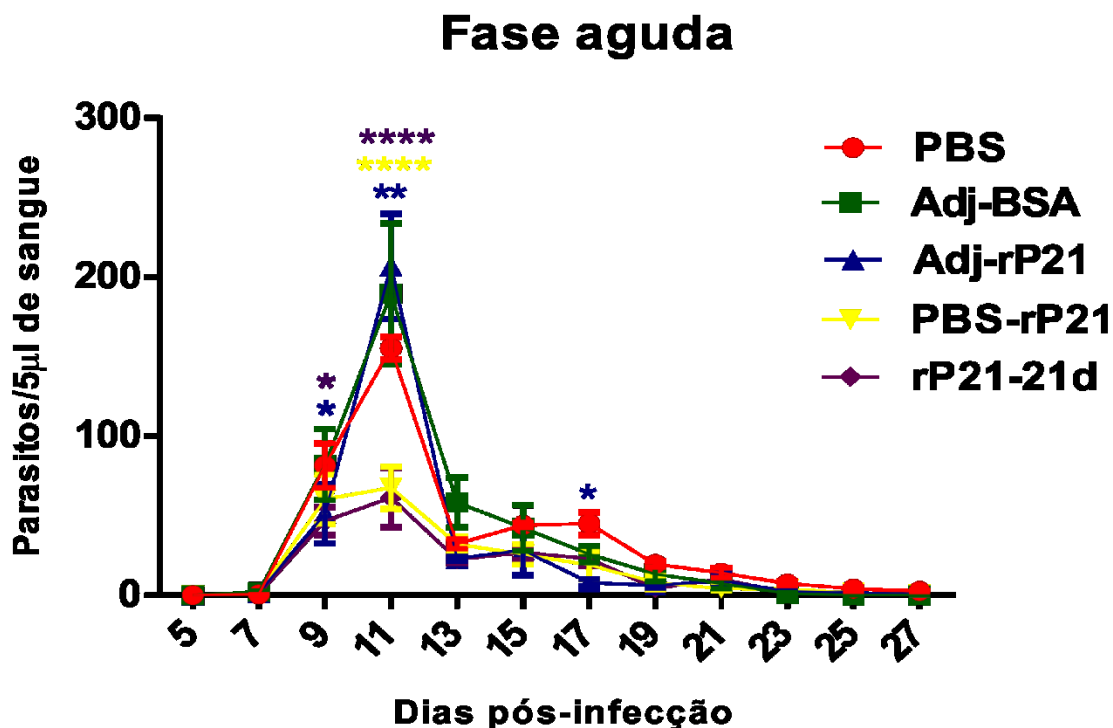


Figura 6 - A imunização com rP21 reduz o número de parasitos na corrente sanguínea dos animais infectados por *T. cruzi* durante a fase aguda. O número de parasitos em 5µl de sangue foi contado nos dias 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 e 27 após a infecção. Os dados correspondem à média de cada animal \pm DP, os dados foram analisados pelo método two-way ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$ com os valores de P indicados na legenda da Figura 6.

4.7 Avaliação da área do baço e do coração dos animais imunizados ou não com a proteína rP21 na fase crônica da infecção por *T. cruzi*

Para avaliar se a imunização com rP21 promovia algum efeito protetor contra a hipertrofia apresentada pelo coração e baço dos animais na fase crônica da infecção por *T. cruzi*, foi realizada a análise da área das imagens obtidas dos órgãos extraídos desses animais (**Figura 7 A-E**) utilizando o software *ImageJ*. A infecção crônica por *T. cruzi* pode resultar na CCC, caracterizada histologicamente por acúmulo de colágeno e fibrose do órgão, decorrente da destruição progressiva de cardiomiócitos; o hospedeiro sofre hipertrofia do coração e insuficiência cardíaca. Já no baço, órgão onde acontece as principais respostas imunológica provenientes do sangue, por meio das células como: linfócitos, macrófagos, células dendríticas

e plasmócitos, a infecção por *T. cruzi* promove uma alta reatividade no baço resultando em esplenomegalia e linfadenopatia com ativação de linfócitos T e B. Foi observado que a análise da área do grupo Adj-rP21 era significativamente menor em relação ao grupo controle PBS (Figura 7 F); nenhuma alteração na área do baço foi detectada quando comparada ao grupo controle PBS (Figura 7 G).

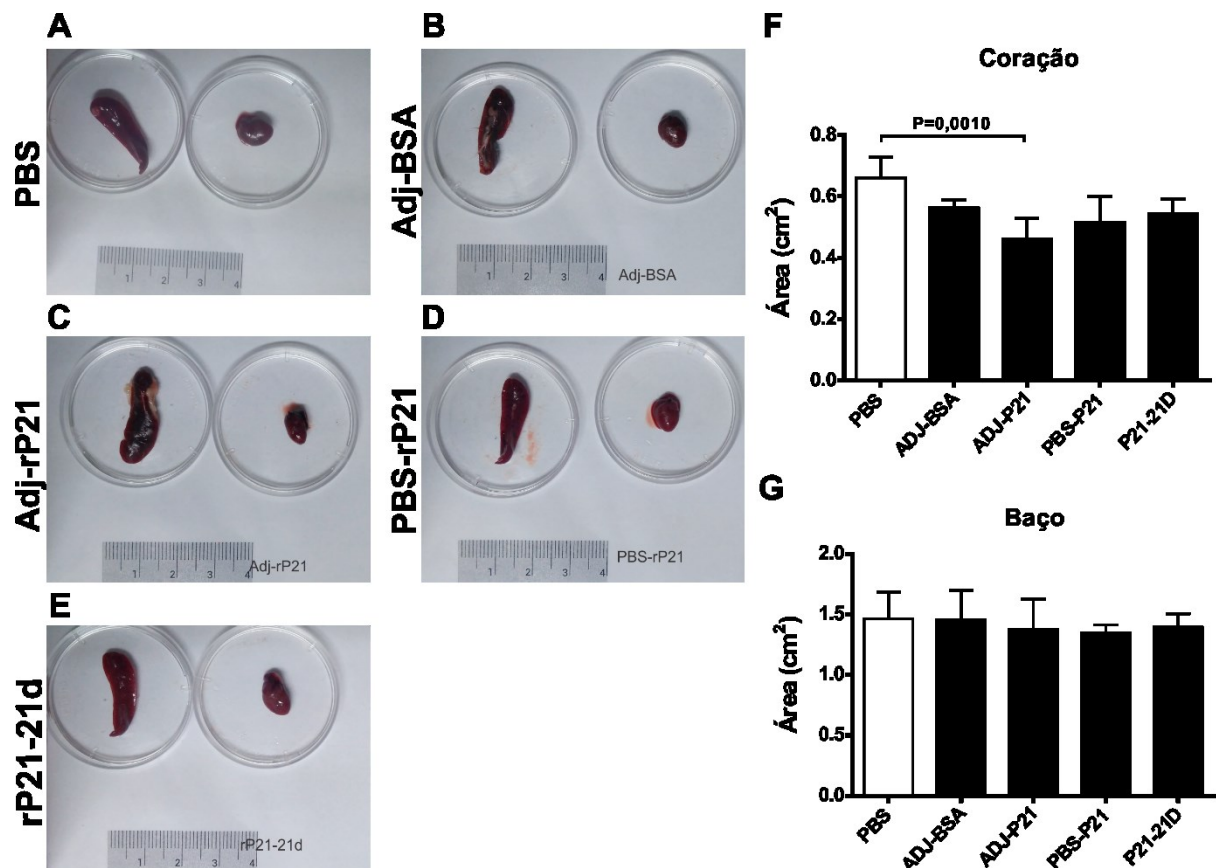
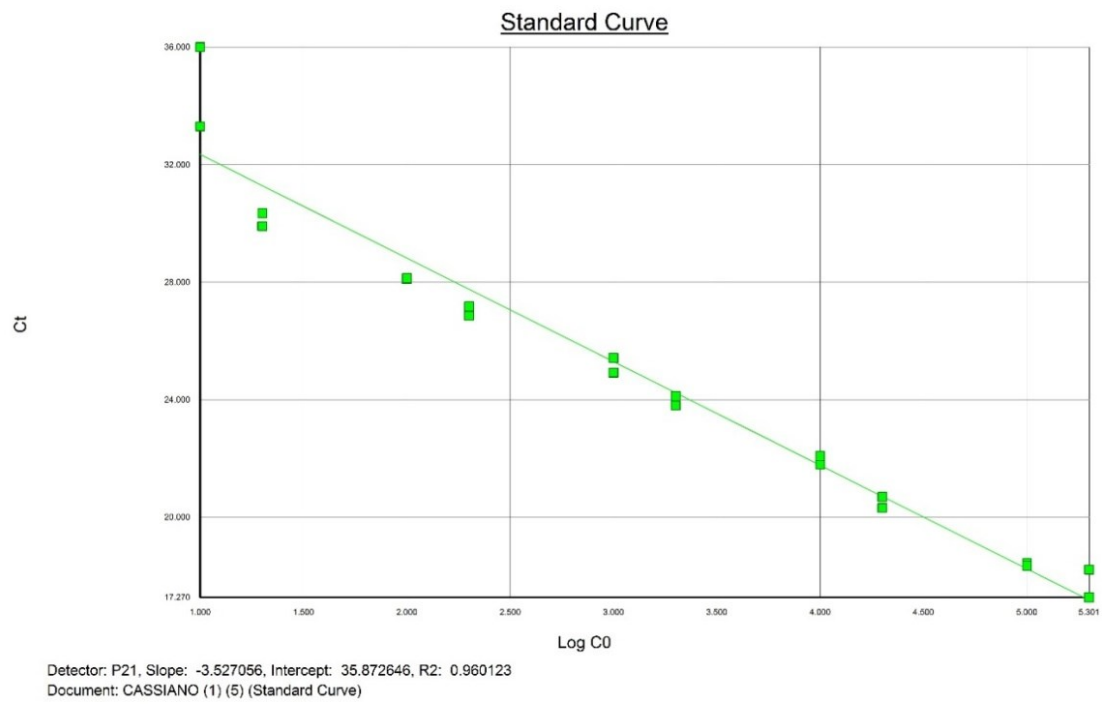
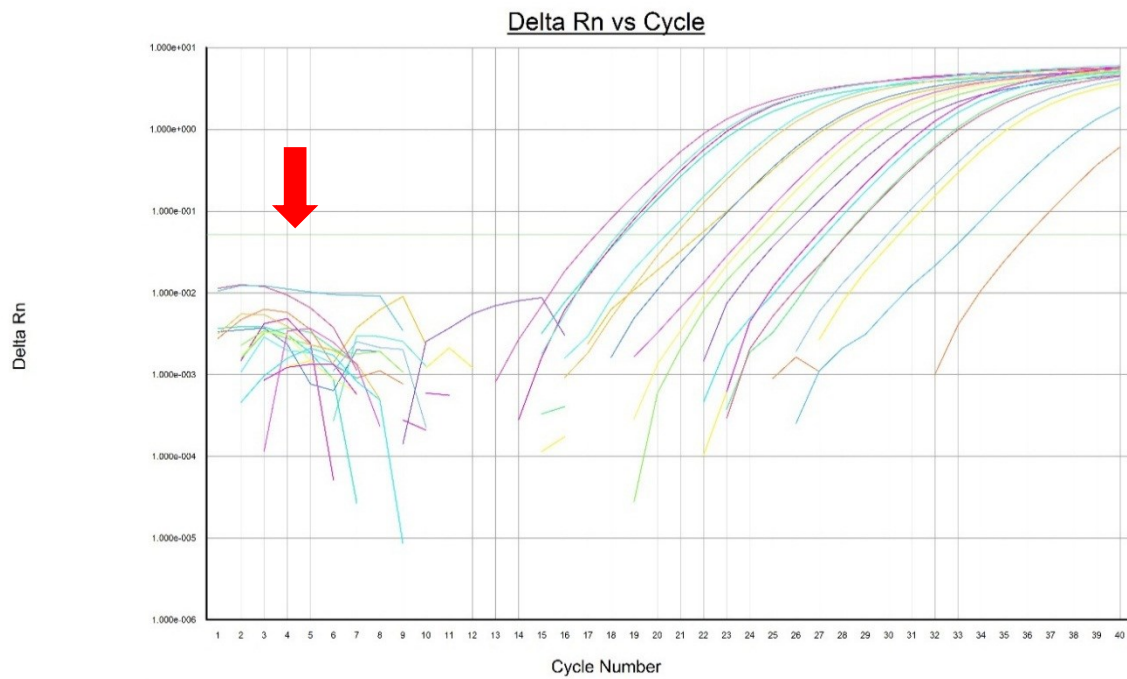


Figura 7 – Análise da área dos órgãos; coração e baço dos animais imunizados ou não com rP21 na fase crônica da infecção por *T. cruzi*. Os camundongos foram imunizados ou não com rP21 e foram infectados com tripomastigotas e avaliados após 90 dias de infecção. (A) PBS (B) Adj-BSA (C) Adj-rP21 (D) PBS-rP21 (E) rP21-21d. (F) grupo Adj-rP21 apresentou área do coração menor em relação ao grupo controle PBS. (G) A área dos baços não apresentou nenhuma alteração quando comparados ao grupo controle PBS. As imagens foram obtidas com uma câmera digital com os mesmos padrões de distância, ângulo e luminosidade e a área dos órgãos foi medida utilizando o *Software ImageJ*. Os dados (F e G) correspondem à média da área em cm² ± DP, e os dados foram analisados pelo método one-way ANOVA Kruskal-Wallis com teste de múltiplas comparações Dunn. Os dados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$ com os valores de P indicados no gráfico.

4.7 A proteína rP21 reduziu a carga parasitária no tecido cardíaco.

Para avaliar o impacto da imunização com rP21 na infectividade do *T. cruzi* no tecido cardíaco, realizamos uma quantificação dos parasitos nos grupos estudados por meio de PCR quantitativo em tempo real. Dessa forma, construímos uma curva a partir de uma diluição em série de DNA de cultura de *T. cruzi*, e de tecido de coração de camundongos que foram utilizados para gerar uma curva padrão contendo 9 pontos (10^8 - 10^0). Logo após, fizemos um PCR em tempo real da curva, para estabelecer a diferença entre os ciclos de amplificação dos diferentes pontos. Nossos dados mostram que a curva foi padronizada, apresentando um $R^2 = 0,96$ e um slope = -3,52 o que comprova a eficiência da reação (**Figura 8 A e B**).

Ao padronizarmos a curva, realizamos o PCR em tempo real com as amostras do coração dos grupos imunizados ou não com rP21, bem como, o grupo controle que não recebeu nenhuma imunização, sendo que todos os animais estavam infectados por *T. cruzi*. Como esperado, foram detectadas cópias de DNA do parasito em todos os grupos infectados de camundongos na fase crônica, porém, os dados demonstram uma diminuição na carga parasitária em todos os grupos imunizados com rP21 em relação ao grupo controle PBS (Figura 9), estes resultados sugerem que a imunização diminuiu a carga parasitária em todos os grupos imunizados com rP21 na fase crônica da infecção, de forma independente da presença de adjuvante junto à rP21.

A**B**

C

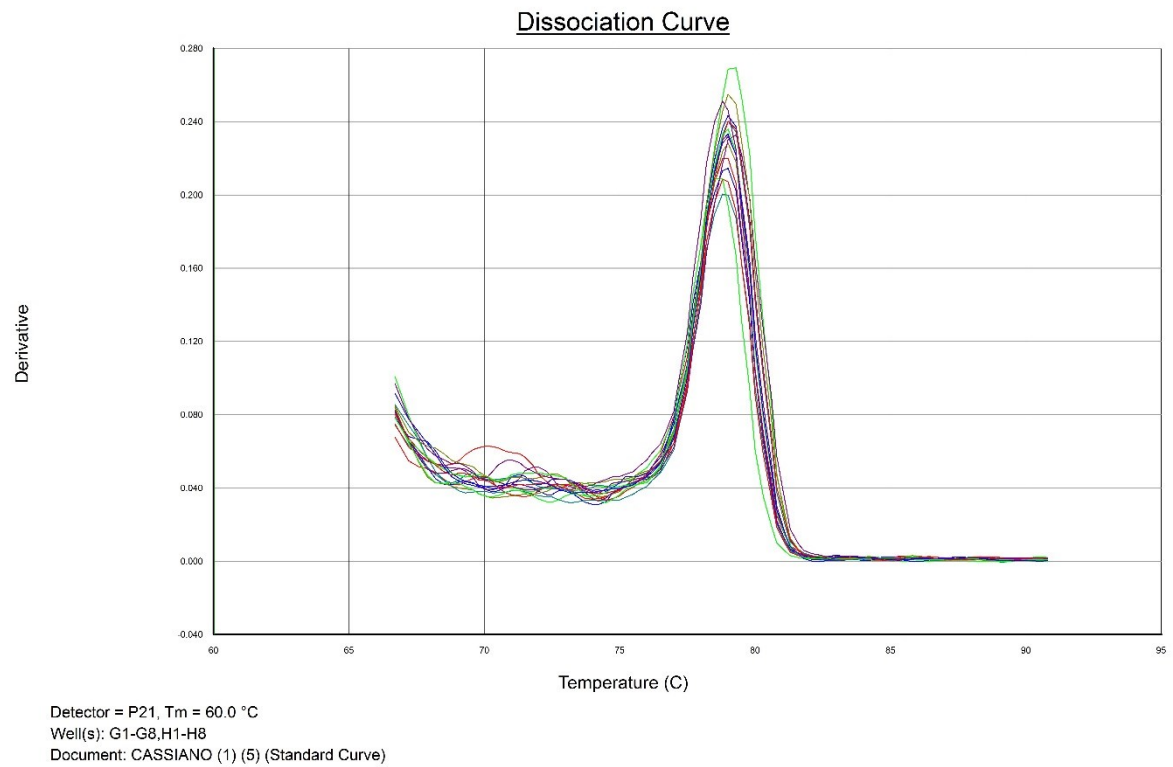


Figura 8 - Análise dos dados representativos do qPCR em tempo real. (A) Curva padrão gerada a partir de 9 diluições em série (10^8 - 10^0); **(B)** Pannel de amplificação da curva por PCR em tempo real. **(C)** Curva de dissociação.

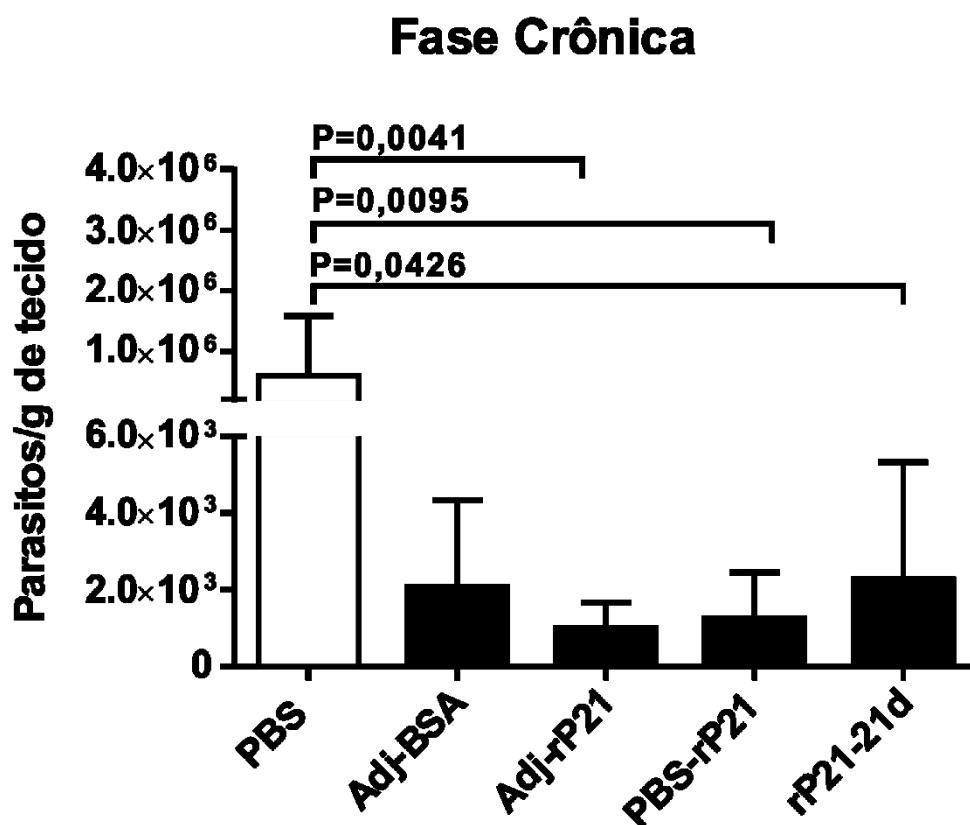


Figura 9 – Redução da carga parasitária no tecido cardíaco dos animais imunizados com rP21 durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*. Após a imunização ou não com rP21 dos camundongos e 90 dias de infecção, realizamos a análise da quantidade de parasitos no coração (PCR em tempo real). Os resultados correspondem às médias das duplicatas \pm DP, os outliers foram removidos de acordo com a sugestão do software GraphPad Prism 6.01 e analisados com método one-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Dunn). Os dados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$, com os valores de P indicados na figura.

4.8 A rP21 associada ao Adjuvante de Freund aumenta a vigilância imunológica contra a infecção por *T. cruzi*

Para estudar o papel protetor da imunização com rP21 na ativação do sistema imunológico e preservação do tecido cardíaco, as alterações histopatológicas foram avaliadas nos órgãos dos animais imunizados ou não com essa proteína. Cortes histológicos corados com H.E permitiram visualizar que houve alterações na resposta de leve (no PBS) para moderada na população de células inflamatórias no grupo Adj-rP21 (++) com leve (+) presença de necrose; ocorreu também, neste mesmo grupo, com leve infiltrado de neutrófilos (+) em comparação aos grupos controle (**Tabela 4**).

No grupo Adj-BSA não foi observado reação inflamatória alguma, apenas uma leve (+) necrose. Em todos os outros grupos avaliados observou-se uma leve reação inflamatória (+) com presença moderada de linfócitos (++) e leve (+) recrutamento de macrófagos e plasmócitos.

Tabela 4 – Caracterização qualitativa e semi-quantitativa do processo inflamatório em cortes histológicos de tecido cardíaco de animais infectados por *T. cruzi*.

	PBS	Adj-BSA	Adj-rP21	PBS-rP21	rP21-21d
Infiltrado inflamatório	+	-	++	+	+
Linfócitos	++	-	++	++	++
Macrófagos	+	-	+	+	+
Neutrófilos	-	-	+	-	-
Plasmócitos	+	-	+	+	+
Necrose	-	+	+	-	-

As características foram classificadas de acordo com intensidade, ausente (-), leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

4.9 Imunização com rP21 reduz a fibrose tecidual no coração dos animais infectados por *T. cruzi*.

Para avaliar se a imunização com rP21 é capaz de proteger o coração e reduzir a fibrose resultante da infecção crônica por *T. cruzi*, cortes histológicos foram analisados e a área ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$) de colágeno total, assim como colágeno do tipo I e III foram determinadas após 90 dias de infecção experimental por *T. cruzi*. Uma das principais características histopatológicas da CCC é a fibrose tecidual no coração dos indivíduos com DC, resultante de uma inflamação

crônica desencadeada por um processo de desequilíbrio na síntese de componentes da matrix extracelular, os quais são produzidos em excesso, sendo que um dos principais componentes envolvidos no processo de fibrose é o colágeno. As imagens obtidas (**Figura 10 A-E**) permitem observar que o grupo Adj-rP21 apresentou diminuição significativa da deposição de colágeno total no coração quando comparados com o grupo PBS (**Figura 10 F**), apesar de haver mais células do sistema imunológico no grupo Adj-rP21, não houve deposição de colágeno total quanto aos demais grupos estudados.

Para avaliar a diferenciação de colágeno tipo I e III usou-se uma análise morfométrica por meio de imagens produzidas a partir do uso de filtro de polarização em microscópio de fluorescência; as imagens foram obtidas de corte histológicos corados com *Picrosirius Red* (**Figura 11 A-E**). Os resultados mostram redução da área preenchida por colágeno do tipo I nos grupos PBS-rP21 e rP21-21d (**Figura 11 F**) quando comparados com o grupo controle PBS; o mesmo ocorre para o colágeno do tipo III em que os animais tratados com PBS e BSA apresentaram área de colágeno mais elevada quando comparados com os grupos imunizados com a proteína rP21 (**Figura 11 G**).

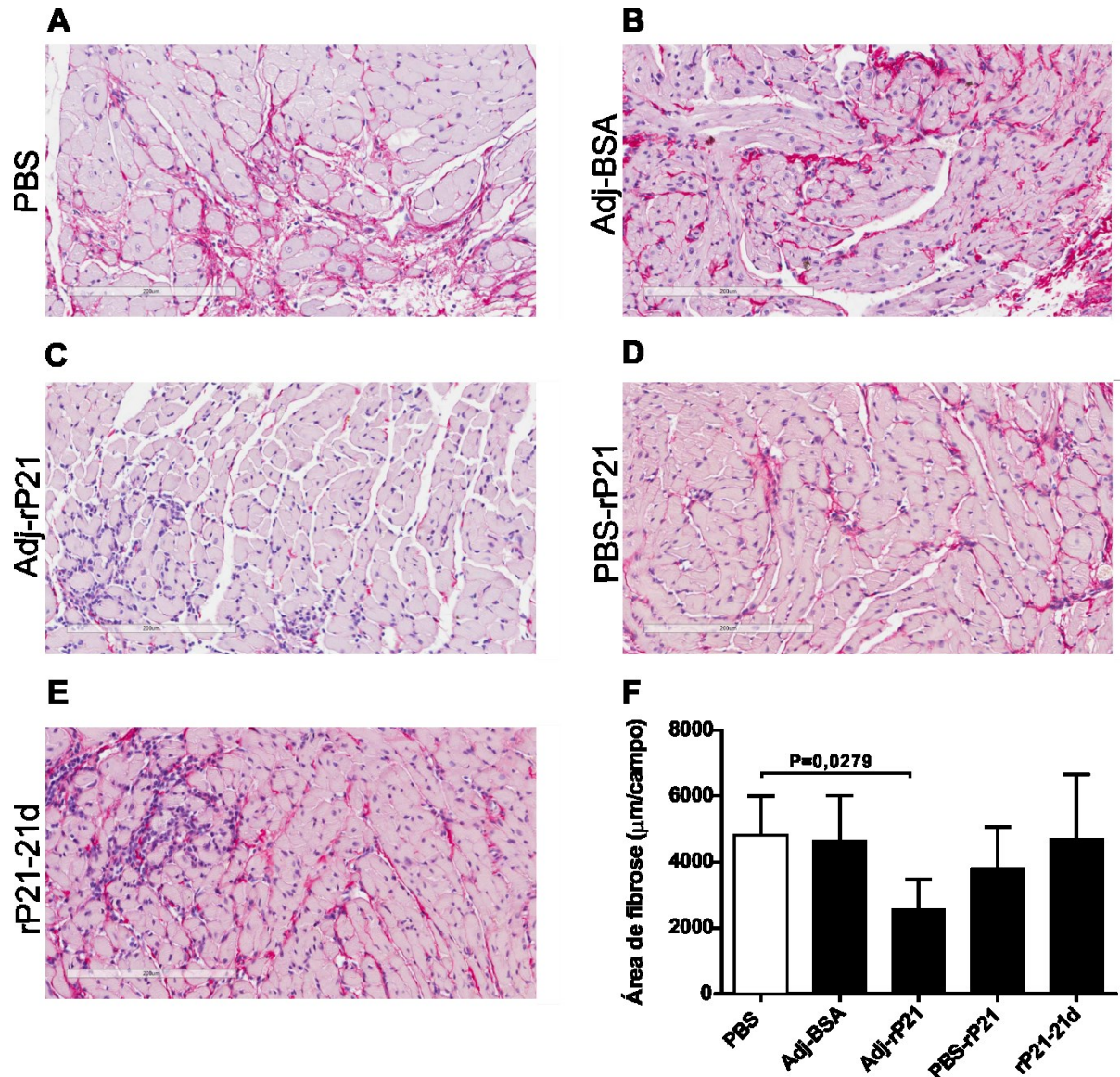


Figura 10 - O processo de imunização com a proteína rP21 associada ao Adjuvant de Freund é capaz de reduzir a fibrose tecidual no coração dos animais infectados com *T. cruzi*. Análise das fotomicrografias representativas da área de fibrose do coração dos animais imunizados ou não com a proteína rP21. (A) Fotomicrografia do corte histológico corado com Picrosirius Red do grupo PBS. (B) grupo Adj-BSA. (C) grupo Adj-rP21. (D) grupo PBS-rP21. (E) grupo rP21-21d. (F) Adj-rP21 apresentou menor área de fibrose em $\mu\text{m}^2/\text{campo}$ quando comparados com o grupo controle PBS. Os dados correspondem às médias da análise morfométrica realizada por meio do software ImageJ das imagens digitais obtidas a partir de 10 campos aleatórios do corte histológico do coração dos animais de cada grupo ($N = 6$ animais por grupo) \pm DP, analisados pelo método one-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Dunn). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$ com os valores de p representados na Figura 12 F.

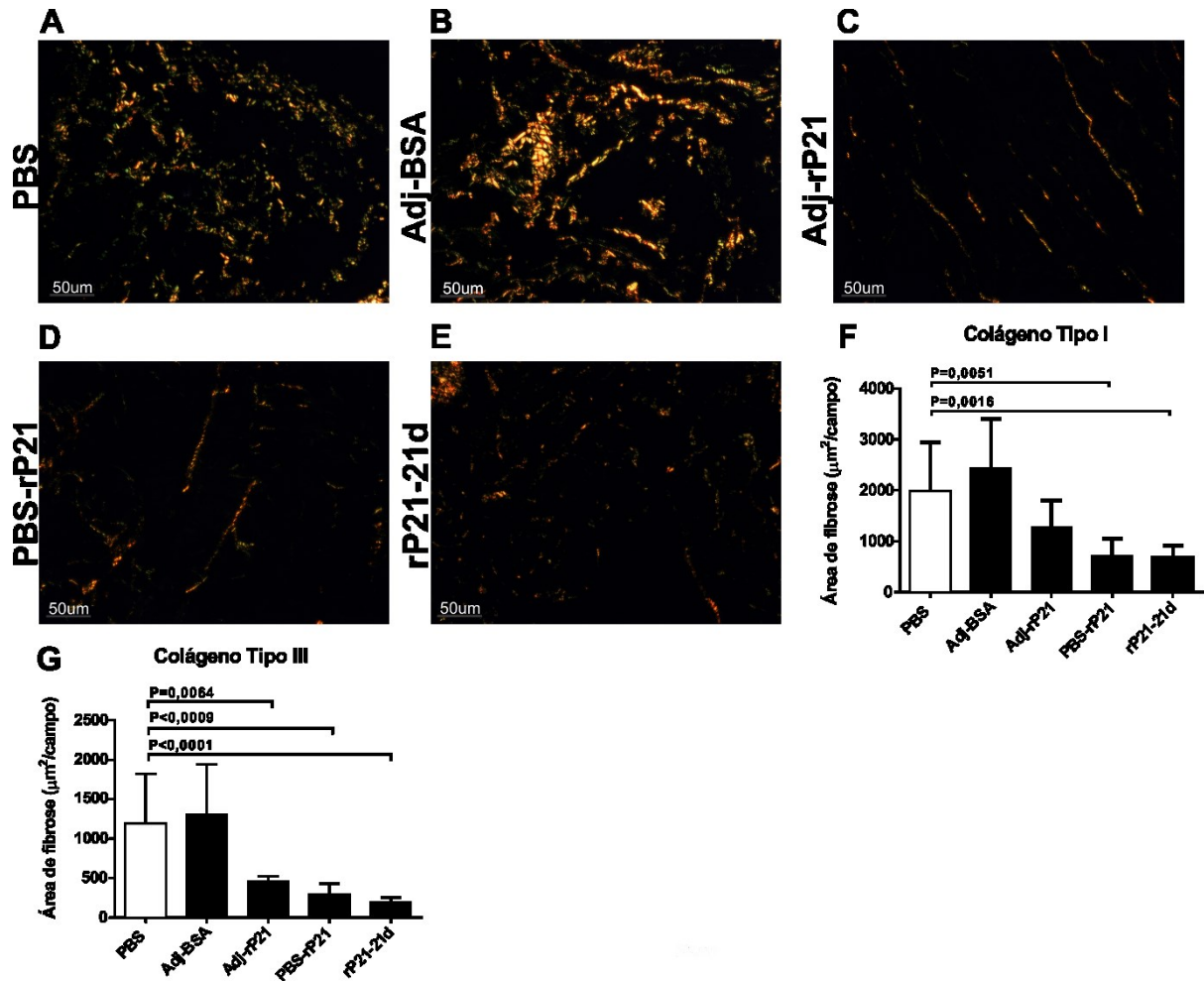


Figura 11 - A imunização com a proteína recombinante rP21 reduz a quantidade de colágeno do tipo I e III. Análise da imunização com a proteína recombinante rP21 por meio de fotomicrografias obtidas a partir de corte histológico do coração e após coloração com Picrosirius Red e analisadas sob luz polarizada destacando os colágenos tipo I e III. (A) Fotomicrografia do grupo dos animais controle PBS. (B) grupo Adj-BSA. (C) grupo Adj-rP21. (D) grupo PBS-rP21 (E) grupo rP21-21d. (F) Os grupos PBS-rP21 e rP21-21d reduziram significativamente a quantidade de colágeno do tipo I quando comparados ao grupo controle PBS (G) Todos os grupos imunizados com a proteína rP21 apresentaram área de colágeno menor quando comparados com o grupo controle PBS. Os dados de A-G correspondem às médias da análise morfométrica realizada por meio do software ImageJ das imagens obtidas a partir de 10 campos aleatórios do corte histológico do coração dos animais de cada grupo (N = 6 animais por grupo) ± DP, analisados pelo método one-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Dunn). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$ com os valores de P representados na Figura 13 F e G.

4.10 A imunização com rP21 aumenta consideravelmente os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-rP21.

Para explorar se a imunização com rP21 promove uma resposta imunológica mais eficaz contra *T. cruzi* avaliou-se quais os isotipos de imunoglobulina G (IgG) estariam presentes no soro dos animais imunizados. Em se tratando de um modelo ideal e eficaz de vacinação, a proteção contra o agente causador da DC está associada com uma resposta imune celular e humoral adequada. Anticorpos são um componente importante da resposta imune contra patógenos, pois evoluíram para classes e subclasses com funções específicas atribuídas como: citotoxicidade, fagocitose e liberação de mediadores de inflamação dentre outros. A implicação desse estudo é que a imunoglobulina G (IgG) em si pode ser um importante promotor de uma resposta imune do tipo Th2. Muitos estudos utilizam os isotipos de IgG como marcadores das respostas Th1 e Th2 contra *T. cruzi*. Durante a infecção por *T. cruzi*, maiores quantidades de anticorpos do isotipo IgG1 em comparação com IgG2a estariam associados a progressão da doença, enquanto maiores quantidades de anticorpos específicos do isotipo IgG2a em comparação ao isotipo IgG1 estariam associados a proteção contra a doença.

Realizou-se um ensaio imunoenzimático para avaliar a presença de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a contra a rP21 e os resultados demonstram que a imunização com rP21 promoveu um aumento nos níveis de IgG total em todos os grupos imunizados com a proteína quando comparados com o grupo controle PBS (**Figura 12 A**). Sendo assim, os resultados também apontam que houve produção de anticorpos IgG1 contra a proteína rP21 em todos os grupos estudados; em contrapartida, os dados não mostraram diferença estatística entre os grupos quando comparados ao grupo controle PBS (**Figura 12 B**). Ao avaliar a produção de IgG2a contra a proteína rP21 houve um aumento na produção de anticorpos no grupo Adj-rP21 quando comparado ao grupo controle PBS (**Figura 12 C**). Em conjunto os resultados sugerem que a imunização com rP21 é capaz de induzir uma resposta humoral eficaz capaz de promover uma proteção contra infecção por *T. cruzi*.

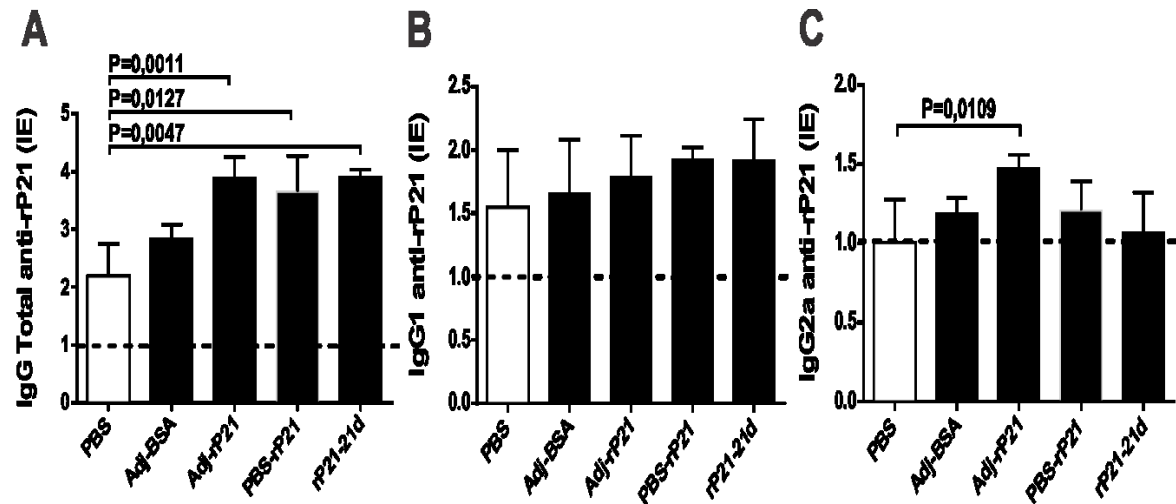


Figura 12 - A imunização com a proteína recombinante rP21 resultou em níveis mais elevados de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-rP21 na fase crônica. Para avaliar a presença de anticorpos contra a proteína rp21 no soro dos animais imunizados realizou-se (ELISA) indireto das amostras (N= 6 animais por grupos). (A) Análise da presença de anticorpos IgG total anti-rP21. (B) Detecção de anticorpos IgG1 no soro dos animais. (C) Análise da presença de anticorpos IgG2a anti-rP21. Os resultados correspondem às médias das triplicatas \pm DP, avaliados pelo método one-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Dunn. Os dados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$, com os valores de p indicados na Figura 12 A-C.

5. DISCUSSÃO

Inúmeros estudos vêm sendo aplicados na tentativa de melhorar o desenvolvimento de vacinas e tratamentos com drogas que tem a capacidade de controlar a infecção por *T. cruzi* com o objetivo de prevenir ou impedir os efeitos agravantes da doença (SANCHEZ-BURGOS et al. 2007). As vacinas apresentam um excelente histórico no sucesso da medicina moderna devido ao impacto drástico sobre a morbidade e mortalidade em todo o mundo, surge então a necessidade crescente de novas vacinas capazes de estimular uma resposta imunológica eficiente e duradoura para a prevenção de doenças infecciosas. Entretanto, no caso da Doença de Chagas, os agentes parasiticidas como benzonidazol tem uma eficácia limitada contra a infecção crônica por *T. cruzi* e não há vacinas profiláticas disponíveis atualmente. Vários estudos se concentram na caracterização de antígenos parasitários que podem ser utilizados como candidatos vacinais (MATOS et al. 2017).

Existem duas principais técnicas de imunização anti-*T.cruzi*, as imunizações convencionais que usam antígenos de parasito completo e os testes não convencionais que são baseados em antígenos recombinantes ou purificados ou semi/purificados (LONGHI et al. 2012). A busca pelo aperfeiçoamento de protocolos, por meio do uso de proteínas recombinantes proporcionará ao tratamento da Doença de Chagas uma melhoria nas condições de vida dos indivíduos que futuramente poderiam vir a entrar em contato com o protozoário, além de auxiliar no tratamento e nas condições de vida de pacientes chagásicos (MATOS et al. 2017).

A proteína P21 nativa é secretada por diferentes cepas do protozoário, e é específica da espécie, não sendo co-relacionada a nenhuma proteína de outra espécie parasitária o que garante uma especificidade na geração de anticorpos contra a mesma, sem nenhum tipo de reação cruzada o que permite usá-la como uma importante ferramenta em modelos de vacinação no tratamento da DC (DA SILVA et al., 2009). Sendo assim, como os resultados demostram, a proteína rP21 mostrou-se promissora porque induziu uma proteção significativa em modelos experimentais de imunização com a proteína contra a infecção por *T. cruzi*.

Duas abordagens experimentais foram usadas nesse estudo, em uma delas avaliamos a imunização com a proteína rP21 em animais saudáveis, sendo que, a imunização dos animais foi realizada usando dois protocolos diferentes. Na primeira abordagem utilizamos concentrações crescentes da proteína recombinante P21 0,5 µg, 1 µg e 10 µg por animal, via subcutânea, e utilizamos apenas PBS como veículo; avaliamos em qual concentração haveria uma resposta imunológica eficiente sem causar aos animais nenhum efeito colateral. Já na

segunda abordagem, ao sabermos qual concentração teve melhor resposta a imunização, associamos a concentração de 10µg/animal da rP21 ao adjuvante de Freund e de acordo com o delineamento experimental, avaliamos se a imunização com a rP21 resultaria em proteção contra a infecção por *T. cruzi*.

Neste estudo, avaliamos a produção de imunoglobulinas G (IgG) anti-rP21, que foram efetivos e demonstraram alta especificidade pela proteína nas reações por ELISA. De acordo com Abras et al. (2016), a utilização de anticorpos policlonais pode diminuir a reação cruzada existente em outros métodos que empregam diferentes *pools* de antígenos. Em estudos não publicados por nosso grupo de pesquisa avaliou-se que tanto na infecção natural (em amostras de humanos chagásicos) quanto pela infecção experimental (em amostras de animais infectados com *T. cruzi* já na fase crônica) o anticorpo policlonal anti-rP21 é capaz de reconhecer a forma nativa da proteína P21 onde se demonstrou que durante a infecção, nos ninhos de amastigotas, há grande produção da proteína.

Ao analisarmos os efeitos que a rP21 desenvolve ao entrar em contato com sistema imunológico dos animais, este estudo foi capaz de demonstrar a utilidade dos anticorpos policlonais IgG total anti-rP21 na proteção contra a infecção por *T. cruzi*. Estudos relacionados apontam que o uso de protocolos de imunização com antígenos do protozoário pode promover uma proteção contra danos causados pela DC por meio de anticorpos reativos a determinados antígenos que favorecem a infecção (MÁLAGA-MACHACA et al. 2017).

A obtenção de protocolos de imunização com a proteína rP21 pode ser uma alternativa para amenizar os problemas enfrentados no tratamento da DC. Alguns estudos já publicados demonstram que a proteína rP21 tem atividade pró-fagocítica, e favorece de forma positiva a ativação de macrófagos a internalizarem os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii* *in vitro* de forma dependente da ligação ao receptor CXCR4, ativando a via de sinalização PI3-quinase (RODRIGUES et al., 2012); o que nos permite inferir que imunização com a proteína rP21 pode favorecer o hospedeiro ao produzir anticorpos anti-rP21 que possam interferir na ligação dessa proteína ao receptor CXCR4 devido a ação do sistema imunológico. Isto está em concordância com estudos prévios, os quais mostram que a proteína P21 pode ser um importante fator de evasão de *T. cruzi* do sistema imune do hospedeiro; em que sua atividade pró-fagocítica permite a permanência intracelular, onde ele possa crescer livremente no citoplasma da célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012).

Dessa forma, os camundongos imunizados com a rP21 desenvolveram respostas específicas a proteína por meio da produção de anticorpos contra o antígeno estudado e que a proteína rP21 pode ser utilizada como uma ferramenta responsável por promover uma

imunidade protetora específica. (MÁLAGA-MACHACA et al. 2017). Em outro estudo, que obteve resultados similares aos aqui relacionados, os autores empregaram protocolos de imunização contra a proteína cruzipaina, que promoveu uma imunidade específica, e uma proteção sistêmica e na mucosa dos animais infectados por *T. cruzi* (SCHNAPP et al. 2002).

A modulação da resposta imunológica para o controle da infecção por *T. cruzi* depende da eliminação do parasito pelos mecanismos de defesa da imunidade inata e adquirida; macrófagos, células NK e linfócitos T e B são necessários para montar uma resposta imune efetiva. Em resumo, a imunização com a proteína rP21 pode promover o desenvolvimento e ativação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória que geralmente são moduladas por células NK e linfócitos B, uma vez que, um menor número de células T de memória são formadas na infecção aguda quando esses subconjuntos estão ausentes (CARDILLO et al. 2015). Durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*, as células B são fundamentais para ativar as células T, relacionadas à via Th1, que favorecem o controle do crescimento do parasito (CARDILLO et al. 2007). Portanto, na ausência de células B maduras, o sistema imunológico é incapaz de gerar ou manter células T CD8⁺ de memória efetivas para instruir um padrão funcional Th1 de citocinas de células T, as respostas inflamatórias nos tecidos desses camundongos são menos intensas na fase aguda da infecção, o que consiste em um déficit na geração de células T efectoras. (CARDILLO et al. 2015). Além disso, o tipo de célula preponderante no infiltrado inflamatório do músculo esquelético na infecção por *T. cruzi* são as células T CD4⁺ (CARDILLO et al., 2007).

Considerando a importância dos linfócitos B, bem como os linfócitos T de memória, na proteção contra a infecção por *T. cruzi*, os indivíduos infectados na fase aguda apresentam comprometimento nas células T efectoras, muito provavelmente pela ausência de estimulação antígenoica contínua, como resultado de uma infecção persistente (CASTRO EIRO et al. 2017).

Entretanto, também é necessário avaliar se a imunização com o antígeno rP21 tem a capacidade de desenvolver uma resposta imunológica exagerada ou provocar alterações sistêmicas significativas que a impossibilite de ser utilizada como ferramenta de compostos vacinais, sendo assim, avaliamos os parâmetros hematológicos dos animais após a imunização com a proteína rP21. Considerando a importância da imunização, com uma concentração adequada de antígeno, que possa promover uma proteção contra a infecção sem causar nenhuma alteração grave.

Alterações típicas no sistema imunológico por antígenos do protozoário *T. cruzi* inclui ativação e expansão de linfócitos T e B em órgãos linfáticos que podem apresentar níveis elevados na corrente sanguínea dos camundongos, essas alterações podem estar associadas a

participação dos linfócitos no processo da resposta inflamatória a determinado antígeno, além disso, antígenos imunogênicos e em grandes concentrações podem provocar anemia devido ao sequestro das células sanguíneas por reação de auto-anticorpos (SANTOS et al. 2007). Dessa forma, a Tabela 3 mostra claramente que a imunização utilizando o antígeno rP21 nas concentrações estabelecidas não altera os parâmetros hematológicos, mas, em contrapartida, estimulou o sistema imune a aumentar o número de linfócitos na corrente sanguínea, na maior concentração utilizada (10µg/animal), não induzindo anemia, pois os parâmetros de hemoglobina e hematócrito estavam elevados.

Contudo, os resultados até aqui descritos demonstram que a proteína rR21 é reconhecida pelo sistema imunológico e tem a capacidade de gerar anticorpos IgG total anti-rP21 estabelecendo resposta imunológica específica ao antígeno estudado, embora existam obstáculos a serem avaliados pela possibilidade do sistema imunológico de induzir seletivamente tolerância a um determinado antígeno que pode ser aplicado tanto ao tratamento de doenças auto-imune, alergias, transplantes, imunodeficiência indesejada como também nas modalidades de vacinação em desenvolvimento (PELLEGRINI et al. 2011).

Para abordar os mecanismos de tolerância do sistema imunológico à proteína rP21, desenvolvemos um modelo de indução de tolerância onde os camundongos foram desafiados sistematicamente todos os dias, durante vinte e um dias, e avaliamos a presença de anticorpos IgG total anti-rP21. Surpreendentemente o sistema imune dos animais não gerou tolerância ao antígeno apresentado mantendo a titulação elevada de anticorpos contra a proteína no soro dos animais. Esses resultados ajudam a elucidar a ideia de que em ninhos de amastigotas presente no tecido cardíaco dos camundongos infectados onde há grande secreção da proteína P21 nativa, a indução de uma resposta imune humoral robusta contra a proteína poderia auxiliar no controle da infecção pelo parasita sem promover nenhuma tolerância devido à persistência do antígeno no meio extracelular.

A complexa interação que ocorre entre as células durante a infecção por *T. cruzi*, gera um papel crítico no desenvolvimento da doença (LAUCELLA et al 2009). Macrófagos são especialistas em reconhecer e apresentar antígenos via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II presente na superfície celular, a imunização com a proteína rP21 pode apresentar uma melhora no desenvolvimento dessas atividades, bem como também na produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, que levaram essas células a ter uma atividade microbicida (CARDILLO et al 2015).

Em um estudo realizado por Teixeira et al. (2015) foi comprovado que a proteína rP21 aumenta o recrutamento de células do sistema imunológico, por ela apresentar atividade

quimiotática e ação pró-inflamatória, o que reforça e embasa nossos resultados de que a imunização forneceria uma resposta humoral robusta contra a produção contínua da P21 nativa pelas formas amastigotas de *T. cruzi*, localizadas no interior de fibras cardíacas; interferindo no recrutamento de leucócitos; consequentemente atenuando um processo de inflamação exagerado e preservando o tecido cardíaco.

Uma das características clínicas na fase aguda da doença está relacionada com a interação do protozoário *T. cruzi* com a resposta imune no hospedeiro. Primeiramente, o parasito infecta a célula hospedeira, por penetração ativa ou por fagocitose promovida por células fagocíticas (DUTRA et al. 2009). Em seguida, o parasito se multiplica no interior da célula e pode também modular a biologia celular, sendo que quando o *T. cruzi* sofre ação por parte do sistema imune, a principal ação do protozoário é modular os mecanismos efetores da defesa imunitária (RODRIGUES et al. 2015).

Para avaliar se a imunização com a proteína rP21 foi capaz de modular a resposta imunológica de tal forma que controlasse a infecção na fase aguda da doença realizamos a quantificação de parasitos presentes na corrente sanguínea, que revelou a importância da proteína rP21 associada ao *Adjuvante de Freud* na modulação da resposta imune para o perfil Th1, que diminuiu a quantidade de parasitos nos grupos de animais imunizados, quando comparados ao grupo de animais que não recebeu nenhum tipo de imunização. Nossos resultados estão em concordância com outros trabalhos que relatam que a ativação precoce do sistema imunológico, por meio de antígenos secretados por *T. cruzi*, ativam células NK e linfócitos B e favorecem a diferenciação dos linfócitos T no fenótipo Th1, levando ao controle da replicação do parasito na fase aguda da doença e como consequência maior resistência do hospedeiro ao *T. cruzi* (CERNY et al. 2016).

O *T. cruzi* pode infectar muitos tecidos, mas apresenta um tropismo por células do tecido cardíaco, logo após a infecção o parasito prolifera e causa inflamação persistente e o sistema imune inato e adaptativo controla o parasito, os pacientes progridem para um estágio assintomático, mas o parasito nunca é eliminado e 30% desses pacientes desenvolvem uma doença disfuncional cardíaca que atualmente afetam milhões de pessoas no mundo (KONDURI et al. 2017).

A análise da área dos órgãos, (coração e baço), na fase crônica da doença, mostrou que os animais do grupo Adj-rP21 apresentaram corações com a área menor em relação ao grupo controle não imunizado (PBS). Este resultado pode ser explicado pelo fato do mesmo grupo ter apresentado um controle maior na infecção na fase aguda da doença. Esta hipótese é respaldada por outros estudos que afirmam que, a imunização com antígenos do *T. cruzi* promove uma

resposta imune humoral e celular melhorada contra a infecção pelo protozoário e possui um papel importante no controle da parasitemia (DUMONTEIL et al., 2012).

A infecção por *T. cruzi* resulta em alta reatividade pelo baço resultando em esplenomegalia; devido à expansão de folículos linfoides e proliferação de linfócitos durante a fase aguda. (CASTRO EIRO et al., 2017). Nossos resultados demonstraram esplenomegalia na fase crônica em todos os grupos estudados, essa resposta pode estar relacionada pela presença do protozoário *T. cruzi* e seus antígenos nos tecidos, promovendo reativação e expansão de células do sistema imune (DUTRA et al., 2009).

Entretanto, não foram observadas diferenças entre a área dos baços na fase crônica da doença, quando comparados com o grupo controle. Este resultado pode estar relacionado a presença de reatividade do sistema imunológico a proteína rP21, por meio de alterações sistêmicas da resposta imune durante a fase crônica, com ativação policlonal de linfócitos T e B (BRYAN et al., 2010). Embora, ainda não se sabe se a esplenomegalia poderia ser resultado da ativação e expansão de linfócitos T e B pelo processo de imunização com a proteína recombinante P21. Sendo assim, a causa do aumento do baço em todos os grupos avaliados precisa ser melhor investigada.

Uma das complicações mais graves ao longo da infecção por *T. cruzi* é o desenvolvimento da CCC, resultante de um processo inflamatório intenso e persistente devido à presença do parasito no tecido cardíaco. Para avaliar a relação da imunização com a proteína rP21 e a infectividade do protozoário *T. cruzi* na fase crônica da infecção, realizamos a quantificação dos parasitos nos diversos grupos por meio de PCR quantitativo em tempo real, e os resultados mostram uma redução na carga parasitária no tecido cardíaco de todos os grupos imunizados com a proteína rP21 quando comparados com o grupo controle (PBS). Sendo assim, a proteína rP21 mostrou-se promissora porque induziu uma proteção significativa em modelos experimentais de imunização contra a infecção por *T. cruzi* no tecido cardíaco dos animais infectado.

Nossos resultados demonstram estar em concordância com estudos prévios que mostraram que a proteína aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos, possui uma atividade quimiotática de leucócitos, além de aumentar a produção de NAG E MPO (RODRIGUES et al. 2012; TEIXEIRA et al. 2015). Assim, podemos concluir que a redução da carga parasitária de *T. cruzi* no tecido cardíaco, pode ser devido a uma melhora na resposta imunológica que conseguiu promover um controle maior da infecção tanto na fase aguda quanto na crônica.

Para melhor compreensão dos resultados obtidos, avaliou-se o escore inflamatório do tecido cardíaco, a fim de verificar quais as populações de célula do sistema imunológico

estavam presentes, bem como, a presença de necrose resultante de um processo infeccioso com reação inflamatória de modo que levasse a uma fibrose reativa, as alterações histopatológicas no coração dos animais imunizados ou não com a proteína rP21 nos diferentes modelos de imunização, bem como seus respectivos grupos controle, foram avaliados por H.E e observou-se um aumento no infiltrado inflamatório que, de acordo com o médico patologista que analisou as amostras, estavam aumentados e mais difusos no grupo Adj-rP21, com uma participação maior de populações de neutrófilos e presença moderada de linfócitos, ainda detectou-se a presença de infiltrado de células do sistema imunológico maior entre as fibras cardíacas no grupo Adj-rP21, disseminado por todo o órgão e com leve presença de necrose em pontos focais.

Todos os outros órgãos dos animais imunizados com a proteína rP21, incluindo o grupo controle exceto o grupo Adj-BSA, tiveram uma leve (+) reação inflamatória, apresentando um recrutamento moderado (++) de linfócitos e leve (+) presença de macrófagos e plasmócitos com ausência (-) de neutrófilos. Assim, concluímos que a imunização com a proteína rP21 associada ao Adjuvante de Freund permitiu uma migração maior de leucócitos para o tecido cardíaco, uma característica denominada endereçamento de leucócitos pelo processo de migração de células do sangue para o tecido (CUNHA-NETO et al., 2014). Nossos resultados nos permitem inferir que a imunização com a proteína rP21 por meio de reestímulo dos leucócitos pela rP21, promoveu uma adesão dos leucócitos ao revestimento endotelial das vênulas pós-capilares e logo em seguida permitiu o movimento através do endotélio e da membrana basal subjacente para dentro do tecido extravascular cardíaco, o que resultou em uma vigilância imunológica maior no grupo Adj-rP21.

Nos órgãos coletados, através da coloração com *Picrosirius Red*, avaliou-se as fibras colágenas tendo em vista visualizar a diferenciação entre colágeno total e subtipos I e III assim como quantificá-los (JUNQUEIRA et al., 1979). Diversos fatores podem influenciar na produção de colágeno pelos diferentes tecidos do organismo, entre elas a utilização de medicamentos, e o processo de cicatrização tecidual desenvolvido por lesões (FANG E HOLL, 2013).

O coração normalmente apresenta pequenas porções teciduais com fibras colágenas e elásticas (MESSAS et al., 2013). As fibras colágenas estão localizadas em maior quantidade revestindo a parede dos vasos sanguíneos cardíacos, as fibras colágenas tipo I e tipo III conferem rigidez e flexibilidade, respectivamente (HANSON et al., 2013); o colágeno do tipo I por ser mais abundante no corpo, é um importante componente no processo de cicatrização de lesões no tecido cardíaco, sendo encontrado elevado em todas as fases de progressão de lesões cardíacas por complicações cardiovasculares (FANG E HOLL, 2013).

Embora, o colágeno do tipo III por ser uma fina fibrila, estudos demonstram um aumento na deposição dessas fibrilas em estágios iniciais de fibrose tecidual por meio de progressão de lesões cardiovasculares (HANSON et al., 2013). A alteração na quantidade de colágeno nas fibras cardíacas pode ser indicativa de algumas doenças cardiovasculares, e o coração é o principal órgão envolvido na fibrose tecidual que ocorre durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*, sendo um dos fatores envolvidos nas complicações da CCC (CALIARI et al., 2002).

Os resultados das análises do colágeno evidenciam a diminuição na quantidade de fibras colágenas totais, bem como os subtipos I e III, estudos com a proteína P21 indicam que ela pode ser de grande importância na fase crônica da doença (TEIXEIRA et al., 2015). A análise morfométrica de colágeno total, bem como a diferenciação de colágenos dos tipos I e III foram avaliadas a partir do uso de filtro de polarização em microscópio. O colágeno total avaliado no coração dos animais imunizados ou não com a proteína rP21 apontou uma redução na deposição de fibras colágenas totais no grupo Adj-rP21.

Análises morfométricas da expressão de colágenos do tipo I e III mostram que, os grupos imunizados com a proteína rP21 apresentaram área reduzida de deposição de fibras colágenas no tecido cardíaco quando comparados com o grupo controle PBS. Tecidos parasitados podem apresentar a deposição de colágeno do tipo I e III em resposta a reação inflamatória no local onde ocorre a fixação do parasito ou pode depositar de forma localizada, perto de regiões vascularizadas ou entre as fibras cardíacas. Em resumo, nossos resultados sugerem que a imunização com a proteína rP21 pode promover uma proteção em diferentes aspectos da patologia da CCC, na infecção por *T. cruzi* à resposta imune, bem como na inflamação e reparo tecidual.

Finalmente, os resultados até aqui descritos sustentam a ideia de que a imunização com a proteína rP21 promoveu uma proteção contra a infecção pelo *T. cruzi* fase aguda quanto na crônica, como também uma redução da deposição de colágeno entre as fibras cardíacas.

Para melhor compreensão dos resultados obtidos, experimentos de dosagem de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-rP21 no soro dos animais durante a fase crônica foram realizados. A classe de imunoglobulinas G são as mais abundantes no soro de humanos e de camundongos, sendo dividida em quatro subclasses (IgG1-IgG4 em humanos e IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 em camundongos) (ASCHERMANN et al., 2010). Nossos resultados sugerem que o controle da infecção por *T. cruzi*, foi dependente de uma resposta imunológica humoral robusta contra a proteína rP21 associada ao Adjuvante de Freund, que permitiu a ampliação dos estímulos de ativação dos mecanismos de defesa da imunidade celular e humoral, estimulando uma resposta imune adequada que controlou a disseminação do parasito.

A imunização com a proteína rP21 aumentou os níveis de IgG total anti-rP21 em todos os modelos de imunização, quando comparados com o grupo controle PBS, e mostrou que os grupos controle apresentaram também produção de anticorpos IgG total contra a proteína devido o parasito secretar a forma P21 nativa. Ao analisarmos se a imunização com a proteína rP21 modulava uma resposta humoral vimos que todos os grupos imunizados com a proteína e os controles também produziram anticorpos IgG1, confirmando nossa hipótese que o controle da infecção foi mediado por uma resposta imune humoral robusta contra o antígeno estudado.

Embora, uma resposta imune somente com perfil Th2 não seja suficiente para conter a disseminação do protozoário. A proteína rP21 associada ao Adjuvante de Freund foi capaz de modular uma resposta Th1 contra o antígeno, promovendo um controle maior da infecção e atenuando os danos cardíacos provocados pela deposição de colágeno no tecido e promovendo uma vigilância imunológica maior nos órgãos desses animais. Os resultados descritos nesse trabalho estão concordância com um consenso geral de que antígenos secretados por *T. cruzi*, que produzem uma resposta humoral aprimorada, desenvolvem níveis mais elevados de anticorpos circulantes IgG1 característico de um perfil Th2 (ASCHERMANN et al., 2010).

Muito embora, uma resposta imunológica humoral robusta induzida pela proteína rP21 ao apresentar níveis de anticorpos do isotipo IgG2a dominante aumentados, está associada a uma imunidade do perfil Th1, e pôde promover uma resistência maior do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi* e aos danos causados pela sua persistência no tecido cardíaco (HIGA et al., 2013). Nossos estudos demostram que a proteína rP21 pode ser utilizada como ferramenta em modelos de vacinação profiláticos contra a DC, pois não apresenta efeitos colaterais, nem toxicidade a níveis sistêmicos, podendo ser administrada em camundongos utilizando outros Adjuvantes mais potentes e com possibilidade de aplicação em humanos.

6. CONCLUSÕES

Com este estudo, concluimos que a imunização de camundongos com a proteína rP21 associada ao Adjuvante de Freund, induziu uma resposta imunológica robusta que permitiu um controle maior da parasitemia na fase aguda, não apresentou efeitos colaterais severos, também reduziu a carga parasitária assim como o dano cardíaco contribuindo para a integridade do miocárdio. Para melhor compreender o impacto da imunização no controle da disseminação do parasita e nos danos causados por ele, mostramos que a modulação de uma resposta imunológica humoral melhorada com perfil Th1 por meio do aumento dos níveis de anticorpos IgG2a anti-rP21, conseguiu validar nossos resultados de que a proteína rP21 associada ao adjuvante de Freund mostrou-se promissora para um modelo de vacinação contra a DC. Nesse contexto, vimos que a imunização com a proteína rP21 levou uma modulação da resposta imunológica positiva a favor do hospedeiro e que sua aplicação poderia permitir novos métodos profiláticos de tratamento para a DC, utilizando metodologias baratas e convencionais para a confecção de um modelo vacinal eficaz.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAS, A; GÁLLEGO, M.; LLOVET, T.; TEBAR, S.; HERRERO, M.; BERENGUER, P.; BALLART, C.; MARTÍ, C.; MUÑOZ C. Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? **J Clin Microbiol**, 2016. <https://doi.org/10.1128/JCM.00142-16>
- ASCHERMANN, S.; LUX, A; BAERENWALDT, A.; BIBURGER, M.; NIMMERJAHN, F. The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation. **Clin Exp Immunol.**, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04081.x>
- BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Front Immunol**, 2013. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186>
- BASSO, B.; MARINI, V.; GAUNA, D.; FRIAS, M. Vaccination of dogs with *Trypanosoma rangeli* induces antibodies against *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Córdoba, Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2016. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160019>
- BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. **Cardiology Clinics**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.08.013>
- BORGES, B. C.; UEHARA, I. A.; DIAS, L. O. S.; BRÍGIDO, P. C.; DA SILVA, C. V.; SILVA M. J. B. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. **Front Cell Infect Microbiol**, 2016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00161>
- BONTEMPI, I.; FLEITAS, P.; POATO, A.; VICCO, M.; RODELES, L.; PROCHETTO, E.; CABRERA, G.; BELUZZO, B.; ARIAS, D.; RACCA, A.; GUERRERO, S.; MARCIPAR, I. Trans-sialidase overcomes many antigens to be used as a vaccine candidate against *Trypanosoma cruzi*. **Immunotherapy**, 2017. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0009>
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, 1973. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000733>
- CARREA, A.; DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146947>
- CARDILLO, F.; DE PINHO, R. T.; ANTAS, P. R.; MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathog Dis**, 2015. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv082>

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J.; AROEIRA, L. S.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8⁺ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, 2007. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01141>

CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; CARRILLO, I.; LIEMPI, A.; GALLARDO, C.; GALANT, N.; MAYA, J. D.; KEMMERLING, U. Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. **Am J Reprod Immunol**. 2017. <https://doi.org/10.1111/aji.12660>

CASTRO EIRO, MELISA. D.; ALVAREZ MARÍA, G.; COOLEY GRETCHEN, VIOTTI RODOLFO. J.; BERTOCCHI GRACIELA, L.; LOCOCO BRUNO, ALBAREDA MARÍA C.; DE RISSIO, ANA M.; NATALE MARÍA, A.; PARODI CECILIA, TARLETON RICK L., LAUCELLA SUSANA A. The Significance of Discordant Serology in Chagas Disease: Enhanced T-Cell Immunity to *Trypanosoma cruzi* in Serodiscordant. **Frontiers in Immunology**, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01141>

CERNY, N.; SÁNCHEZ ALBERTI A.; BIVONA A E. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, 2016. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1078044>

CEVEY, Á.C.; MIRKIN, G.A.; PENAS, F. N.; GOREN, N.B. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.12.001>

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/683230>

CRUZ, J. S.; MACHADO, F. S.; ROPERT, C.; ROMAN-CAMPOS, D. Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- β . **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.08.003>

DA SILVA, C. V.; KAWASHITA S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRÓN, T. C.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M. R.; ANDREWS, N. W.; MORTARA, R. A. Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes Infect**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, 2002. PMID: 11860366

DEGEN, W. G.; JANSEN, T.; SCHIJNS, V. E. Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications. **Expert Rev Vaccines**, 2003. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.2.327>

DIAS, P. P.; CAPILA, R. F.; DO COUTO, N. F.; ESTRADA, D.; GADELHA F. R.; RADL, R. Cardiomyocyte oxidants production may signal to *Trypanosoma cruzi* intracellular development. **PLoS Negl Trop Dis**, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005852>

DIAS, J. C. Brazilian Consensus on Chagas Disease, **Rev Soc Bras Med Trop**, 2016. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>

DOS SANTOS, M. A. A infecção das células B por *Trypanosoma cruzi* resulta em ativação da Caspase-7, clivagem proteolítica da PLC γ 1 e morte celular. Uberlândia: UFU, 2017. 67. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia.

DOS SANTOS, M. A.; TEIXEIRA, F. B.; MOREIRA, H. H.; RODRIGUES, A. A.; MACHADO, F. C.; CLEMENTE, T. M.; BRIGIDO, P. C.; SILVA, R. T.; PURCINO, C.; GOMES, R. G.; BAHIA, D.; MORTARA, R. A.; MUNTE, C. E.; HORJALES, E.; DA SILVA, C. V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep04259>

DUMONTEIL, E.; BOTTAZZI M. E.; ZHAN B.; HEFFERNAN M. J.; JONES K.; VALENZUELA, J.; KAMHAWI, S.; ORTEGA, J.; ROSALES, S. P.; LEE, B. Y.; BACON, K. M.; FLEISCHER, B.; SLINGSBY, B. T.; CRAVIOTO, M. B.; TAPIA-CONYER, R.; HOTEZ, P. J. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. **Expert Rev Vaccines**, 2012. <https://doi.org/10.1586/erv.12.85>

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N.; DA COSTA, G. C.; DA SILVEIRA, A. B.; REIS, D. D.; GOLLOB, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009. PMID: PMC3285444

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol**, 1973. PMID: 4583055

FANG, M.; HOLL, M. M. Variation in type I collagen fibril nanomorphology: the significance and origin. **BoneKey Reports**, 2013. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.128>

FARROW, A. L.; RACHAKONDA, G.; GU L.; KRENDELCHTCHIKOVA, V.; NDE, P. N.; PRATA, P. S.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F.; MATTHEWS, Q. L. Immunization with Hexon modified adenoviral vectors integrated with gp83 epitope provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003089>

FERNANDES, M. C.; ANDREWS N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHAES, L.M. Patologia Clínica Veterinária. 2a Edição. Belo Horizonte: Editora Rabelo, 1982.

GADELHA, F. R.; GONCALVES, C. C.; MATTOS, E. C.; ALVES, M. J.; PINEYRO, M. D.; ROBELLO C. Release of the cytosolic trypanothione peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. **Exp Parasitol**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.007>

GEBREKRISTOS, H. T.; BUEKENS P. Mother-to-Child Transmission of *Trypanosoma cruzi*. **J Pediatric Infect Dis Soc**, 2014. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu059>

GUPTA, S.; SMITH C.; AUCLAIR S.; DELGADILLO, A. D. J.; GARG, N. J. Therapeutic Efficacy of a Subunit Vaccine in Controlling Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease Is Enhanced by Glutathione Peroxidase Over-Expression. **PLOS ONE**, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130562>

HANSON, K. P.; JUNG J. P.; TRAN, Q. A.; HSU, S. P.; IIDA, R.; AJETI, V.; CAMPAGNOLA, P. J.; ELICEIRI, K. W.; SQUIRRELL, J. M.; LYONS, G. E.; OGLE, B. M. Spatial and temporal analysis of extracellular matrix proteins in the developing murine heart: a blueprint for regeneration. **Tissue Eng Part A**. 2013. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0316>

HENRIQUES, H. R.; RAMPAZO E. V.; GONCALVES A. J. S.; VICENTIN E. C. M.; AMORIM J. H. Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002330>

HIGA, L. H.; CORRAL, R. S.; MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L.; PETRAY, P. B. Archaeosomes display immunoadjuvant potential for a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin Immunother*. 2013. PMID: PMC3859765

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI M. E.; FRANCO-PAREDES C.; AULT S. K.; PERIAGO M R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop**, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300>

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. <https://doi.org/10.7476/9788575413937>

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>

KINOSHITA-YANAGA, A. T. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 2009. PMID:19893984

KONDURI, V.; HALPERT, M. M.; LIANG, D.; LEVITT, J. M.; CRUZ-CHAN, J. V.; ZHAN, B.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J.; JONES, K. M.; DECKER, W. K. Genetic Adjuvantation of a Cell-Based Therapeutic Vaccine for Amelioration of Chagasic Cardiomyopathy. **Infect Immun.** 2017. <https://doi.org/10.1128/IAI.00127-17>

KYLE, A.; WEGNER. ADIB KEIKHOSRAV, I.; KEVIN, W. ELICEIRI.; CHAD M. VEZINA. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 2017. <https://doi.org/10.1369/0022155417718541>

LAUCELLA, S. A.; MAZLIAH D. P.; BERTOCCHI G.; ALVAREZ M. G.; COOLEY G.; VIOTTI R.; ALBAREDA M. C.; LOCOCO B.; POSTAN M.; ARMENTI A.; TARLETON R. L. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers oftreatment efficacy. **Clin Infect Dis**, 2009. <https://doi.org/10.1086/648072>

LEIBY, D. A.; NGUYEN, M. L.; PROCTOR, M. C.; TOWNSEND R. L.; STRAMER S. L. Frequency of *Trypanosoma cruzi* parasitemia among infected blood donors with a potential association between parasite lineage and transfusion transmission. **Transfusion**, 2017. <https://doi.org/10.1111/trf.14082>

LESCURE, F. X.; LE LOUP, G.; FREILIJ H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS L. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis**, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70098-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70098-0)

LONGHI, S. A.; BRANDARIZ, S. B.; LAFON, S. O.; NIBORSKI, L. L.; LUQUETTI, A O.; SCHIJMAN, A. G.; LEVIN, M. J.; GÓMEZ K. A. Evaluation of in house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. **Am J Trop Med Hyg**, 2012. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0533>

LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, A.; QUEREJETA, R.; DÍEZ, J. The use of collagen derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heartdisease. **J Hypertens**. 2005. PMID: 16003166

MACHADO, F. S.; MARTINS G. A.; ALIBERTI J. C.; MESTRINER F. L.; CUNHA F. Q.; SILVA J S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, 2000. PMID: 11113053

MÁLAGA-MACHACA, E. S.; ROMERO-RAMIREZ A.; GILMAN R. H.; ASTUPIÑA-FIGUEROA S.; ANGULO N.; FLORENTINI A.; LOVON-LUQUE C. J.; GONZA R. A.; DEL CARPIO-SANZ, A.; CABELLO I.; CAMARGO R.; RECUENCO F.; BARRUETA-SORIA L. A.; VERASTEGUI M. R.; CALDERON M.; MAYTA H. Polyclonal antibodies for the detection of *Trypanosoma cruzi* circulating antigens. **PLoS Negl Trop Dis**, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006069>

MARTINS, F. A. Citocinas, citoesqueleto de actina e a P21 de *Trypanosoma cruzi* na multiplicação intracelular do parasito in vitro. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 68f. 2015.

- MATOS, M. N.; CAZORLA S. I.; SCHULZE K.; EBENSEN T.; GUZMÁN C. A. Immunization with Tc52 or its amino terminal domain adjuvanted with c-di-AMP induces Th17+Th1 specific immune responses and confers protection against *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Negl Trop Diseases**, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005300>
- MEHTA, N.; CHACKO, P.; JIN, J.; TRAN, T.; PRIOR, T. W.; HE, X.; AGARWAL G.; RAMAN, S. V. Serum versus Imaging Biomarkers in Friedreich Ataxia to Indicate Left Ventricular Remodeling and Outcomes. **Texas Heart Institute Journal**, 2016. <https://doi.org/10.14503/THIJ-14-4198>
- MERAD, M.; SATHE P.; HELFT J.; MILLER J.; MORTHA A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- MINEO, J. R. Medidas de Biossegurança em laboratórios. Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia (EDUFU), 2005.
- MORILLO, C. A.; MARIN-NETO J. A.; AVEZU M. A.; SOSA-ESTANI S.; RASSI A. J. R.; ROSAS F.; VILLENA E.; QUIROZ R.; BONILLA R.; BRITTO C.; GUHL F.; VELAZQUEZ E.; BONILLA L.; MEEKS B.; RAO-MELACINI P.; POGUE J.; MATTOS A.; LAZDINS J.; RASSI A.; CONNOLLY S. J.; YUSUF S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
- MORTARA, R. A.; ANDREOLI W. K.; FERNANDES M. C.; DA SILVA C. V.; FERNANDES A. B.; L'ABBATE C.; DA SILVA S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Subcell Biochem**, 2008. PMID: 18512345
- MCKEON, G. P.; NAGAMINE, C. M.; RUBY, N. F.; LUONG, R. H. Hematologic, Serologic, and Histologic Profile of Aged Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 2011. PMID: PMC3103279
- NOGUEIRA, R. T.; NOGUEIRA A. R.; PEREIRA M. C. S.; RODRIGUES M. M.; NEVES P. C. D. C.; GALLER R.; BONALDO M. C. Recombinant Yellow Fever Viruses Elicit CD8+ T Cell Responses and Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059347>
- NUNES, M. C.; DONES W.; MORILLO C. A.; ENCINA J. J.; RIBEIRO A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- PATINO, L. H.; RAMÍREZ, J. D. RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. **Infect Genet Evol**, 2017.
- PELLEGRINI, A.; CARRERA-SILVA E. A.; AROCENA A.; CANO R. C.; AOKI M. P.; GEA S. *Trypanosoma cruzi* antigen immunization induces a higher B cell survival in BALB/c mice, a susceptible strain, compared to C57BL/6 B lymphocytes, a resistant strain to cardiac autoimmunity. **Med Microbiol Immunol**. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0192-3>
- PEREIRA I. R.; VILAR-PEREIRA G.; SILVA A. A.; MOREIRA O. C.; BRITTO C.; SARMENTO E. D.; LANNES-VIEIRA J. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for

immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. **Mediators of inflammation**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/798078>

PEREIRA JÚNIOR, C. E. B.; MARKMAN FILHO, B. Clinical and echocardiographic predictors of mortality in Chagasic cardiomyopathy--systematic review. **Arq Bras Cardiol**, 2014. PMID: PMC4079025

PÉREZ-MOLINA, J. A.; PEREZ-AYALA A.; MORENO S.; FERNANDEZ-GONZALEZ M C.; ZAMORA J.; LOPEZ-VELEZ R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**, 2009. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp357>

PESSOA, C. A. Rodentia – Roedores de companhia (hamster, gerbil, cobaia, chinchila, rato). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, I. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

PINAZO, M. J.; GASCON J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). **Acta Trop**. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.013>

RAMPAZO, E. V.; AMORIM K. N. S.; YAMAMOTO M. M.; PANATIERI R. H.; RODRIGUES M. M.; BOSCARDIN S. B. Antigen Targeting to Dendritic Cells Allows the Identification of a CD4 T-Cell Epitope within an Immunodominant *Trypanosoma cruzi* Antigen. **PLoS ONE**, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117778>

RASSI, A. J. R.; RASSI A.; MARIN-NETO J. A. Chagas Disease. **Lancet**, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

REIGNAULT, L. C.; BARRIAS E. S.; SOARES MEDEIROS L. C.; DE SOUZA W.; DE CARVALHO T. M. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Parasitol Res**, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3887-8>

RODRIGUES, A. A.; SAOSA J. S.; DA SILVA G. K.; MARTINS F. A.; DA SILVA A. A.; SOUZA NETO C. P.; HORTA C. V.; ZAMBONI D. S.; DA SILVA J. S.; FERRO E. A.; DA SILVA C. V. IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Negl Trop Dis**, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001598>

RODRÍGUEZ-MORALES, O.; MONTEÓN-PADILLA V.; CARRILLO-SÁNCHEZ S. C.; RIOS-CASTRO M.; MARTÍNEZ-CRUZ M.; CARABARIN-LIMA A.; ARCE-FONSECA M. Experimental vaccines against Chagas disease: a journey through history. **J. Immunol**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/489758>

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE T. M.; DOS SANTOS M A.; MACHADO F. C.; GOMES R G B. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **PLoS ONE**, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

SANTOS, C. D.; LEVY A. M.; TOLDO M. P.; AZEVEDO A. P.; PRADO J. C JR. Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Vet Parasitol**. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.038>

SANTOS, F. L.; DE SOUZA W. V.; BARROS MDA S.; NAKAZAWA M.; KRIEGER M. A.; GOMES YDE M. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. **Am J Trop Med Hyg.** 2016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0820>

SANCHEZ-BURGOS, G.; MEZQUITA-VEGA R. G.; ESCOBEDO-ORTEGON J.; RAMIREZ-SIERRA M. J.; ARJONA-TORRES A.; OUAISSI A.; RODRIGUES M. M.; DUMONTEIL E. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00251.x>

SEID, C. A.; JONES K. M.; POLLET J.; KEEGAN B.; HUDSPETH E.; HAMMOND M.; W E. I. J.; MCATEE C. P.; VERSTEEG L.; GUTIERREZ A.; LIU Z.; ZHAN B.; RESPRESS J. L.; STRYCH U.; BOTTAZZI M. E.; HOTEZ P. J. Cysteine mutagenesis improves the production without abrogating antigenicity of a recombinant protein vaccine candidate for human Chagas disease. **Hum Vaccin Immunother.** 2017. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1242540>

SOUZA, B. S. F; SILVA D. N; CARVALHO R. H; SAMPAIO G. L. A; PAREDES B. D; ARAGÃO FRANÇA L; AZEVEDO C. M; VASCONCELOS J. F; MEIRA C. S; NETO P. C; MACAMBIRA S. G; DA SILVA K. N; ALLAHDADI K. J; TAVORA F; DE SOUZA NETO J. D; DOS SANTOS R. R; SOARES M. B. P. Association of Cardiac Galectin-3 Expression, Myocarditis, and Fibrosis in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Am J Pathol.** 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.016>

SCHNAPP, A. R.; EICKHOFF C. S.; SIZEMORE D.; CURTISS 3R.; HOFT D. F. Cruzipain Induces Both Mucosal and Systemic Protection against *Trypanosoma cruzi* in Mice. **Infection and Immunity**, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.5065-5074.2002>

SCHINJS, V.E.J.C. Immunological Concepts of Vaccine Adjuvant Activity. **Current Opinion in Immunology**, 2000

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001>

TANOWITZ, H. B.; MACHADO F. S.; JELICKS L. A.; SHIRANI J.; DE CARVALHO A. C.; SPRAY D. C.; FACTOR S. M.; KIRCHHOFF L. V.; WEISS L. M. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*- induced heart disease (Chagas disease). **Prog Cardiovasc Dis**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2009.02.001>

TEIXEIRA, T. L.; MACHADO F. C.; ALVES DA SILVA A.; TEIXEIRA S. C.; BORGES B C.; DOS SANTOS M. A.; MARTINS F. A.; BRÍGIDO P. C.; RODRIGUES A. A.; NOTÁRIO A. F.; FERREIRA B. A.; SERVATO J. P.; DECONTE S. R.; LOPES D. S.; ÁVILA V. M.; ARAÚJO F. D. E. A.; TOMIOSSO T. C.; SILVA M. J.; DA SILVA C V. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for Chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific Reports**, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16877>

TEIXEIRA, S. C.; LOPES D. S.; GIMENES S N.; TEIXEIRA T. L.; DA SILVA M. S.; BRÍGIDO R. T.; DA LUZ F A.; DA SILVA A. A.; SILVA M. A.; FLORENTINO P. V.; TAVARES P. C.; DOS SANTOS M. A.; ÁVILA V. M.; SILVA M. J.; ELIAS M.

C.; MORTARA R A.; DA SILVA C. V. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Scientific Reports**, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44978>

TEIXEIRA, A. R.; HECHT M. M; GUIMARO M. C; SOUSA A. O; NITZ N. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, 2011. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, 2003.

WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B. S.; DREW, M.E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Science**, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1491-1>

WOOLSEY, A. M; SUNWOO L; PETERSEN C. A; BRACHMANN S. M; CANTLEY L. C; BURLEIGH B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of cell science**, 2003. <https://doi.org/10.1242/jcs.00666>

WHO, 2017. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/Chagas/disease/en/>). Acesso em: 15/01/2018.

YOSHIOKA, K.; TOHDA, M.; TAKEMURA, T.; AKANO, N.; MATSUBARA, K. et al. Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen. **Journal Pathology**, 1990. <https://doi.org/10.1002/path.1711620207>



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 077/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Estudo do efeito inibitório induzido por peptídeos sintéticos sobre as atividades biológicas da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **10 de outubro de 2014**.

(We certify that the protocol nº 077/14, about “Estudo do efeito inibitório induzido por peptídeos sintéticos sobre as atividades biológicas da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 10/10/2014).

Uberlândia, 13 de outubro de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU