

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* na inflamação e na
infecção crônica experimental *in vivo*.

Thaise Lara Teixeira

Uberlândia

2018

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* na inflamação e na
infecção crônica experimental *in vivo*.

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial a obtenção do título de
Doutora.

Thaise Lara Teixeira

Claudio Vieira da Silva
Orientador

Uberlândia
2018

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

T266p
2018 Teixeira, Thaise Lara, 1987
 Papel da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* na inflamação e na
 infecção crônica experimental *in vivo* / Thaise Lara Teixeira. - 2018.
 92 f. : il.

 Orientador: Claudio Vieira da Silva.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.462>
 Inclui bibliografia.

 1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas,
Doença de - Teses. 4. Neovascularização - Teses. I. Silva, Claudio Vieira
da, 1972- I. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Thaise Lara Teixeira

“Papel da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* na inflamação e na infecção crônica experimental *in vivo*”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 27 de abril de 2018.


Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM


Prof. Dr. Fernando Lourenço Pereira
UFTM


Prof. Dra. Veridiana de Melo R. Ávila
IBTEC/UFU


Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
IBTEC/UFU


Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo – coordenador
ICBIM/UFU

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus companheiros do Laboratório de Tripanosomatídeos, e ao meu “mestre” Prof. Claudio pelos exemplos e ensinamentos de liberdade e igualdade.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.*

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

“Agradeço a Consciência Divina que me irriga com paz. Os meus equívocos vão sendo elucidados e me acalmo, considerando as imensas possibilidades de equilíbrio que estão ao meu alcance. Diante de mim, o presente elaborando o futuro, e o passado são as lições aprendidas e as vantagens do conhecimento servindo-me de suporte para o crescimento interior. Confio e me renovo, tranquilizando-me no bem.”

Agradeço aos meus pais, Neide e Dimas, que são a minha base, minha força e os meus exemplos. Aos amigos e familiares. Agradeço ao meu esposo Bruno, pela paciência e compreensão. Agradeço ao Claudio, foi com ele e devido a oportunidade que me deu que cresci, amadureci, e tive as primeiras conquistas no mundo científico. E aos colegas e amigos do LATRI, que lado a lado, trabalhando em conjunto, conseguimos produzir algum conhecimento científico. E nada mais, a todos que citei apenas digo obrigada, sou em minha totalidade GRATIDÃO.

Finalizo meus agradecimentos com um pensamento que gosto de ler e reler nos momentos de aflição: “Há um fluxo e refluxo de força que me percorre o ser e me impulsiona ao prosseguimento. De mim depende coordenar os movimentos, eleger a meta e avançar. Submetendo-me a essa força vital, tudo me torna acessível, e creio que poderei chegar ao bom termo das minhas aspirações em paz”.

Lista de Abreviaturas

AM – Amazonas
BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro
BHI – *Brain Heart Infusion*
bFGF – Fator de crescimento de fibroblasto básico
Ca⁺ – Íons de cálcio
CCC – Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CO₂ – Dióxido de carbono
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – dimetilsulfóxido
DTU – *Discrete Typing Units*
E.B – Extrato bacteriano
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
Fc-γ – Receptor Fc - gama
Gp30- Glicoproteína 30
Gp35/50 – Glicoproteína 35/50
Gp63 – Glicoproteína 63
Gp82 – Glicoproteína 82
Gp90 – Glicoproteína 90
HE – Hematoxilina e eosina
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
IFN-γ – Interferon-gama
IL-1β – Interleucina-1beta
IL-4 – Interleucina-4
IL-12 – Interleucina-12
kDa – Quilodalton
LIT – *Liver infusion triptose médium*
LPG - Lipofosfoglicano
LPS – Lipopolissacarídeos
MAC – Complexo de ataque a membrana
MPO – Mieloperoxidase
NAG – N-acetil-β-d-glucosaminidase

NK – Células matadoras naturais (*natural killer*)
NO – Óxido nítrico
NLRs – Receptores do tipo NOD
O₂⁻ – Radical superóxido
ONOO⁻ – Peroxinitrito
PBS – Tampão fosfato salino
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PPRs – Receptores de reconhecimento padrão
rpm – Rotações por minuto
rP21 – P21 recombinante
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RS – Rio Grande do Sul
SFB – Soro fetal bovino
sFlt-1 – Tirosina quinase 1 solúvel
SOD – Superóxido dismutase
TC-TOX – Hemolisina de *T. cruzi*
TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TLRs – Receptores do tipo *Toll*
TS- Trans-sialidase
T(SH)₂ – Tripanotona ditol
TXN – Triparedoxina
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VP – Vacúolo parasitóforo

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema das formas evolutivas do *T. cruzi*.

Figura 2. Esquema do ciclo de vida do *T. cruzi*.

Figura 3. Esquema do processo de purificação da proteína rP21;

Figura 4. Esquema do implante da esponja de poliéster (modelo de inflamação crônica) em camundongos C57BL/6 e da cinética de tratamento;

Figura 5. Esquema da infecção experimental com *T. cruzi* / *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e da cinética de tratamentos;

Figura 6. rP21 aumenta a produção de IL-4 e promove a expressão de mieloperoxidase (MPO);

Figura 7. rP21 inibe angiogênese e aumenta a deposição de colágeno;

Figura 8. Componentes do soro murino não interferem na atividade biológica da rP21;

Figura 9. rP21 favorece infecção por *L. amazonensis*, mas não por *T. cruzi*;

Figura 10. rP21 diminui carga parasitária no tecido cardíaco infectado com *T. cruzi*;

Figura 11. rP21 induz produção de anticorpos, mas demonstra atividade direta sobre a replicação e o ciclo celular de *T. cruzi*;

Figura 12. Proposta do papel da P21 no processo de cronificação da infecção por *T. cruzi*;

Figura 13. Peptídeo (P1) é capaz de inibir a polimerização de actina mas não a quimiotaxia induzida na presença de rP21;

Figura 14. P1 é capaz de inibir a atividade anti-angiogênica induzida pela rP21;

Figura 15. P1 inibe a invasão e aumenta a replicação de *T. cruzi* em iMo.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Análise do infiltrado inflamatório nos insertos dos diferentes grupos tratados;

Tabela 2. Análise do infiltrado inflamatório nos diferentes tecidos e grupos tratados.

Sumário

Resumo.....	13
Abstract.....	14
1. Introdução	15
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.2 Doença de Chagas	17
1.3 Cardiomiopatia chagásica crônica	19
1.4 Interação entre <i>T. cruzi</i> e a célula hospedeira	21
1.5 Resposta imune na infecção por <i>T. cruzi</i>	22
1.6 Proteína P21 de <i>T. cruzi</i> e seu papel na biologia do parasita	26
1.7 Modelo de estudo para inflamação: implante esponjoso sintético	29
1.8 Principais características de <i>Leishmania</i> spp.	31
1.9 Peptídeos e suas aplicações	33
2. Justificativa.....	35
3. Objetivos	36
3.1 Objetivos Gerais.....	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. Material e Métodos.....	36
4.1 Aspectos éticos e local de estudo.....	36
4.2 Animais	37
4.3 Parasitos e células.....	37
4.4 Purificação da proteína rP21 e do extrato bacteriano.....	38
4.5 Modelo Experimental de Inflamação.....	38
4.6 Análises bioquímicas.....	39
4.7 Perfil inflamatório e contagem de vasos	41
4.8 Teste de estabilidade da rP21 em soro murino	41
4.9 Infecção experimental com <i>T. cruzi</i> ou <i>L. amazonensis in vivo</i>	42
5.0 Análise Histopatológica	43
5.1 PCR quantitativo em tempo real.....	44
5.2 Produção de anticorpos anti-rP21	45
5.3 Ensaio de replicação <i>in vitro</i>	45
5.4 Análise do ciclo celular de <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i> tratados com rP21	45
5.5 Obtenção do peptídeo sintético ligante da rP21 (P1)	46
5.6 Viabilidade celular	46
5.7 Imunofluorescência indireta	46
5.8 Quimiotaxia <i>in vitro</i> na presença de rP21, P1 e P1S.....	47
5.9 Angiogênese.....	47
6.0 Ensaio de invasão e replicação com peptídeos e rP21	47

6.1 Análise estatística	48
7. Resultados e Discussão	48
7.1 rP21 aumenta a produção da citocina IL-4 e recruta macrófagos para o local da inflamação	48
7.2 rP21 demonstra atividade anti-angiogênica e induz deposição de colágeno	52
7.3 rP21 apresenta estabilidade biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	55
7.4 rP21 atua de maneira espécie-específica.....	56
7.5 rP21 e a CCC.....	59
7.6 rP21 modula a replicação e o ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	62
7.7 Peptídeo ligante inibe atividades da P21	65
8. Conclusões	69
9. Referências bibliográficas.....	70
10. Produção científica durante o doutorado	90
Anexos	

Resumo

T. cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas. Esse protozoário, após entrar no hospedeiro vertebrado, é capaz de invadir inúmeras células nucleadas. Para isso, se utiliza de proteínas secretadas que têm atividade modulatória na infecção. A proteína P21 é secretada por *T. cruzi* e apresenta atividades biológicas importantes, como promover a fagocitose e a polimerização do citoesqueleto de actina nas células hospedeiras. Neste estudo, nós descobrimos outras atividades biológicas da P21. Utilizando modelo de inflamação crônica (esponja de poliéster) em murinos, demonstramos que a P21 possui atividade quimiotática, indução da produção de Interleucina-4 e fibrose e, inibição da angiogênese. Avaliamos ainda, a infecção crônica por *T. cruzi* comparado com a infecção por *L. amazonensis*, também em murinos, na presença da P21. Neste caso, a P21 foi capaz de aumentar a carga parasitaria de *L. amazonensis* e, de forma contrária, inibiu a replicação de *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro*. Além disso, demonstramos que nos camundongos tratados com a rP21, o tecido cardíaco apresentou focos inflamatórios intensos, maior deposição de colágeno, e inibição da angiogênese. A partir disso, com o intuito de inibir a P21, nós realizamos uma série de ensaios *in vitro*, utilizando um peptídeo sintético (P1) ligante da proteína. Vimos que o P1 inibiu a polimerização de actina e a atividade anti-angiogênica da P21. E ainda, foi capaz de reduzir a invasão e induzir a replicação de *T. cruzi* em macrófagos. Portanto, a P21 apresenta importante papel no contexto da infecção por *T. cruzi* e pode ser um alvo em estudos terapêuticos para doença de Chagas.

Palavras chave: Doença de Chagas, proteína P21, angiogênese, fibrose, replicação intracelular.

Abstract

T. cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. This protozoan, upon entering the vertebrate host, is able to invade a wide of nucleated cells. For this, it uses secreted proteins that have modulatory activity in the infection. The P21 protein is secreted by *T. cruzi* and exhibits important biological activity, such as promoting phagocytosis and polymerization of the actin cytoskeleton in host cells. In this study, we discovered other biological activities of P21. Using a model of chronic inflammation (polyester sponge) in murine, we demonstrated that P21 has chemotactic activity, induction of Interleukin-4 production, fibrosis, and inhibition of angiogenesis. We also evaluated chronic *T. cruzi* infection compared to *L. amazonensis* infection, also in murine, in the presence of P21. In this case, P21 was able to increase the parasite load of *L. amazonensis* and, conversely, inhibited the replication of *T. cruzi in vivo* and *in vitro*. In addition, we demonstrated that in mice treated with rP21, cardiac tissue exhibited intense inflammatory foci, increased collagen deposition, and inhibition of angiogenesis. From this, in order to inhibit P21, we performed a series of in vitro assays using a synthetic peptide (P1) binding the protein. We have seen that P1 inhibited actin polymerization and the anti-angiogenic activity of P21. In addition, it was able to reduce invasion and induce replication of *T. cruzi* in macrophages. Therefore, P21 plays an important role in the context of *T. cruzi* infection and may be a target in therapeutic studies for Chagas' disease.

Keywords: Chagas disease, P21 protein, angiogenesis, fibrosis, intracellular replication

1. Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae. É caracterizado pela existência de um flagelo único e do cinetoplasto, uma organela que contém DNA, relacionada ao fornecimento de energia para movimentação do flagelo (BRENER, 1973; WHO, 2017).

Em seu ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas distintas: tripomastigota, amastigota e epimastigota (SOUZA, et al., 2014) (**Figura 1**). A forma tripomastigota não possui capacidade replicativa, e corresponde às formas infectantes extracelulares, localizadas, em ambos os hospedeiros vertebrado e invertebrado. Morfologicamente os tripomastigotas apresentam forma alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo e o flagelo forma uma extensa membrana ondulante (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

Os amastigotas correspondem a forma infectante intracelular, assim são encontradas apenas nos hospedeiros vertebrados. Essas formas se caracterizam por apresentar morfologia arredondada ou oval, com a presença de um flagelo curto que não se exterioriza (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

Já a forma epimastigota é encontrada no trato digestório de triatomíneos e nas glândulas anais de gambás, animais reservatórios. A morfologia dos epimastigotas é alongada, com cinetoplasto justa nuclear e anterior ao núcleo, com flagelo e membrana ondulante disposta lateralmente. O desenvolvimento entre os estágios é um processo complexo, com modificações antigênicas e fisiológicas dependentes da interação com os hospedeiros (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

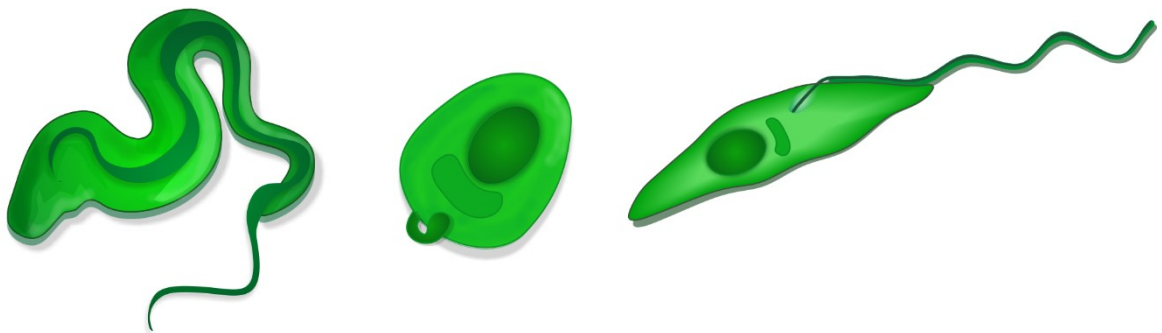


Figura 1. Esquema representativo das formas evolutivas do *T. cruzi*. A. Tripomastigota; B. Amastigota; C. Epimastigota. Figura adaptada de DOS SANTOS, M. A., 2017.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxênico, ou seja, envolve um hospedeiro vertebrado (ex: mamíferos, incluindo o homem) e um hospedeiro invertebrado (vetor), insetos hemípteros da Família Reduviidae e subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como “barbeiros”. Os gêneros dos triatomíneos (vetores) de maior relevância no contexto da infecção por *T. cruzi* são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BARRETO, 1979).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (**Figura 2**) inicia-se quando o inseto vetor (fêmea hematófaga) faz o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas, as quais sofrem uma sequência irreversível de modificações ao longo do sistema digestório do inseto e se transformam em formas epimastigotas replicativas. Estas formas se replicam intensamente e, devido ao estresse nutricional a que são submetidas, se transformam em formas tripomastigotas metacíclicos na porção final do intestino (reto) do vetor. Quando o inseto pica um novo hospedeiro expulsa essas formas infectantes juntamente com as fezes e urina, depositadas no local da picada. Os tripomastigotas penetram ativamente pela pele ou mucosas, e potencialmente, invadem células nucleadas de vários tecidos e se transformam em formas amastigotas. Essas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas, que após o rompimento da célula hospedeira, são liberados para corrente sanguínea podendo invadir outras células ou serem sugados novamente pelo inseto vetor, fechando assim o ciclo (BRENER, 1973; DE SOUZA, 2000; RASSI; RASSI JR, 2008).

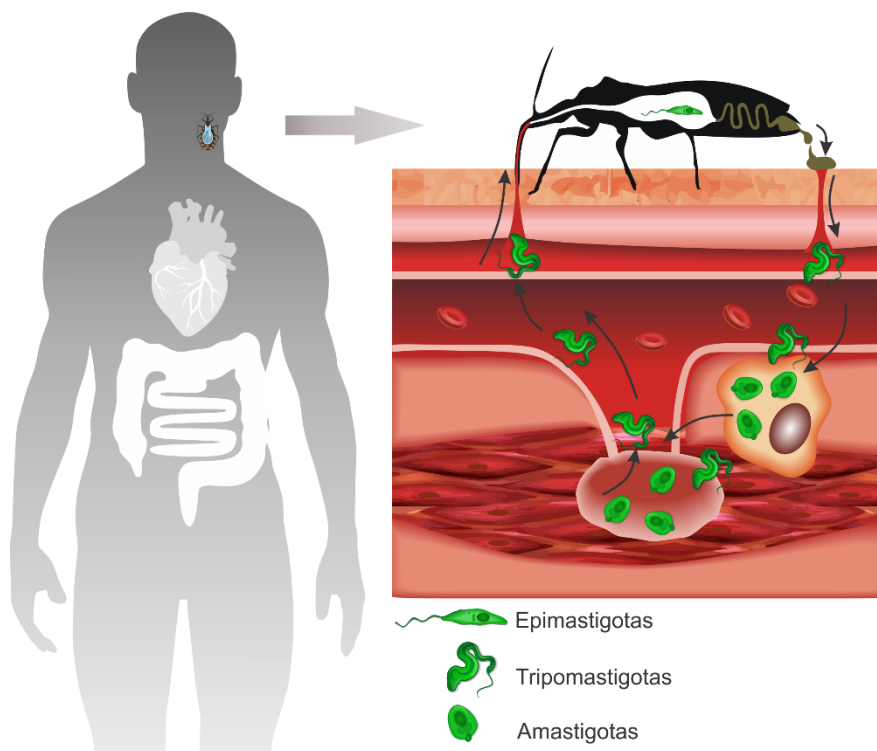


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida do *T. cruzi*. Figura adaptada de DOS SANTOS, M. A., 2017.

T. cruzi não constitui uma população homogênea, esta é formada por alta variação intraespecífica genotípica e fenotípica. Diferentes cepas circulam na natureza, entre o homem, vetores, animais domésticos e silvestres. Essas subpopulações apresentam comportamento diverso no que se refere a curvas de parasitemia, interação com células e resposta imune do hospedeiro. Além de parâmetros biológicos, a utilização de métodos de biologia molecular permite caracterizar as diferentes cepas de *T. cruzi* (BRENER, 1973). A análise de uma enorme quantidade de clones selvagens mostra que o tamanho do genoma pode variar 48 % entre as cepas (LEWIS, et al., 2009; ZINGALES, 2017). Atualmente, as linhagens do parasito são divididas em 7 grupos ou DTUs (*Discrete Typing Units*) *T. cruzi* I a VI e Tcbat (ZINGALES, et al., 2009; MARCILLI, et al., 2009; ZINGALES, et al., 2012; LIMA, et al., 2015). Esta classificação foi realizada baseada no padrão genético, bioquímico e na presença de marcadores biológicos nas diversas linhagens conhecidas. Apesar da reprodução do parasito ser predominantemente clonal, existem evidências de troca de material genético, gerando linhagens híbridas (ZINGALES, 2017).

1.2 Doença de Chagas

T. cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana). Estima-se a existência de 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10000 mortes por ano (WHO 2017). No mundo, cerca de 40 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção, constituindo assim um grande problema de saúde pública (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006; WHO, 2017).

No Brasil, vários surtos da infecção por *T. cruzi* tem ocorrido nas últimas décadas, principalmente, na região Norte do país. Em 2016 a Divisão de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado de Saúde do Acre (Sesacre) divulgou dados, os quais mostram que, em apenas 7 meses, o número de casos comprovados de Doença de Chagas no Acre aumentou mais de 200% em relação ao registrado durante todo o ano de 2015 (INST.BIO.FIOCRUZ, 2016).

Além do mecanismo vetorial descrito acima, a transmissão da Doença de Chagas pode ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecções laboratoriais acidentais, transplantes de órgãos e atualmente, de forma mais comum, pela ingestão de alimentos contaminados com formas infectantes (ex: açaí e cana de açúcar) (DIAS, 1992; SUARÉZ, et al., 2012; WHO, 2017). A sobrevivência do parasito nas bebidas por mais de 24 horas após contaminação (SUARÉZ, et al., 2012) significa uma janela de tempo que permite fácil infecção por via oral, que se manifesta com prognóstico ruim e alta mortalidade (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, et al., 2015).

O primeiro surto de infecção humana por *T. cruzi* pela via oral foi relatado em 1968, no município de Estrela (RS), onde 17 pessoas apresentaram um quadro agudo da doença de Chagas e seis morreram (COURA, et al., 2002). Além disso, no período entre 1968 a 2000, mais de 50% dos casos agudos de doença de Chagas registrados na Amazônia brasileira foram atribuídos a microepidemias de infecção transmitidas oralmente (COURA, et al., 2002). Em 2018, só em janeiro, 10 casos já foram confirmados no município de Lábrea (AM) (SUSAM, 2018).

A infecção por *T. cruzi* possui apresentação clínica variável. O início da infecção, chamada de fase aguda, é caracterizada por grande número de parasitos circulantes no sangue que pode perdurar por cerca de 6 a 8 semanas. Nesta fase, os sintomas podem ser moderados ou atípicos como dores no corpo, febre, poliadenia, e mais raramente hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiência cardíaca, podendo assim, serem confundidos com diversas outras infecções (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; ANDRADE, et al., 2011). Por essa razão a Doença de Chagas não é frequentemente diagnosticada neste estágio (WHO, 2017). Neste período da infecção, as formas amastigotas se encontram no interior de fibras cardíacas, células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos.

Após a fase aguda, os sobreviventes entram na fase crônica da doença, podendo o indivíduo permanecer na chamada forma indeterminada por vários anos ou persistir indefinidamente (PEREIRA NUNES, et al., 2013). A manifestação da forma indeterminada é caracterizada pela positividade de exames sorológicos ou parasitológicos, ausência de sintomas clínicos relevantes, baixa ou nenhuma parasitemia (parasitos ficam ocultos, principalmente no coração, e tubo digestório) (ANDRADE, et al., 2011; PEREIRA NUNES, et al., 2013). Dessa forma, pessoas infectadas vivendo em áreas endêmicas constituem importantes reservatórios do parasito, podendo transmitir as formas infectantes para insetos vetores e assim disseminar a doença (CUCUNUBÁ, et al., 2016).

Até 20 anos após a infecção, aproximadamente 35% dos pacientes apresentam sinais clínicos característicos da fase crônica da doença de Chagas, como cardiomiopatia ou cardiomegalia, danos no sistema nervoso periférico ou disfunção no trato digestório podendo levar ao desenvolvimento de megacólon e/ou megaesôfago (WHO, 2017). Isto ocorre devido a mudanças fisionômicas e anatômicas do miocárdio e do tubo digestório.

O tratamento específico é padrão para todas as modalidades de transmissão e deve ser iniciado o quanto antes. O objetivo do tratamento é curar a infecção, prevenir lesões nos órgãos ou diminuir a evolução das mesmas, e diminuir a possibilidade de transmissão (congenita, transfusão ou transplante) (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017).

O tratamento da doença de Chagas consiste basicamente na utilização do benzonidazol (Rochagan), o qual a dose varia de acordo com a idade e o peso do paciente. As reações adversas mais frequentes são dermatites, neuropatia, náuseas, vômitos e diarreia. O efeito mais grave, porém, menos frequente, é hipoplasia medular (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). E ainda, a utilização do medicamento é contraindicado para pacientes grávidas ou com deficiência severa nos rins e fígado (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017).

O tratamento durante a fase aguda na doença é recomendado e atinge taxas elevadas de eficácia. Entretanto na fase crônica, na qual não está claro ainda o papel do parasito, existem controvérsias sobre os benefícios do tratamento (MARIN-NETO, et al., 2007). Além disso, já foi descrito que o benzonidazol tem efeitos mutagênicos e cancerígenos (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006).

Assim, a terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz. Diversas drogas têm sido testadas em animais, mas nenhuma consegue suprimir a infecção por *T. cruzi* e promover a cura definitiva em todos os tratados devido à resistência natural apresentada por algumas populações do parasito. Há ainda, diferenças regionais de suscetibilidade do *T. cruzi* às drogas, o que na verdade reflete a variação genética da espécie. Cepas isoladas de pacientes, reservatórios e vetores demonstram resistência à droga em condições experimentais (JANNIN; VILLA, 2007).

A ausência de evidências robustas para apoiar o tratamento universal de todos os pacientes com doença de Chagas utilizando a droga disponível, traz a questão do tratamento específico para a agenda global de saúde pública. Fazendo um apelo para testar drogas mais eficazes e seguras bem como, incentivam estudos com o objetivo de obter melhor entendimento das relações patógeno- hospedeiro durante a fase crônica da doença (FRANCO- PAREDES; BOTAZZI; HOTEZ, 2009).

1.3 Cardiomiopatia chagásica crônica

O envolvimento cardíaco é considerado a mais importante manifestação da Doença de Chagas (CUCUNUBÁ, et al., 2016). A cardiomiopatia chagásica é uma miocardite crônica que afeta todas as câmaras do coração, nervos cardíacos parassimpáticos e todo o sistema de condução sanguíneo (MARIN-NETO, et al., 2007).

Na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) a principal manifestação clínica é a insuficiência cardíaca congestiva que ocorre devido à perda de massa muscular, destruída pela infecção e substituída por áreas de fibrose, interrompendo fibras e fascículos (SAMBIASE, et al., 2010). Outro fator responsável pelas arritmias é o aneurisma de ponta, uma lesão no ápice dos ventrículos, na qual há diminuição de células musculares e consequente herniação do

miocárdio (SAMBIASE, et al., 2010; NUNES, et al., 2013). Além da insuficiência cardíaca, causando retardo da circulação e hipóxia, são comuns os fenômenos tromboembólicos (NUNES, et al., 2013).

Os trombos cardíacos são frequentes, ocorrem em cerca de 76% dos casos da Doença de Chagas que desenvolvem insuficiência cardíaca, mas podem também se formar nos membros inferiores. A partir da formação dos trombos, podem desprender-se êmbolos que migram pela corrente sanguínea, impedem a circulação e originam infarto do miocárdio, embolia nos pulmões, rins, baço, encéfalo e etc., causando morte súbita. E ainda, o comprometimento do sistema sinoatrial traz uma variedade de patologias (arritmias e extrassístoles), envolvendo tanto a formação de estímulos elétricos quanto a sua propagação (RIBEIRO, et al., 2011; BARROS, et al., 2011; REGUEIRO, et al., 2013).

Assim, quando os mecanismos de compensação cardíacos se tornam incapazes de superar as deficiências de sua força de contração, surgem os quadros de insuficiência cardíaca, que se traduz clinicamente por dispneia de esforço, insônia, congestão visceral, edema dos membros inferiores, evoluindo em dispneia contínua, anasarca e morte. Pacientes com esse quadro apresentam cardiomegalia intensa (NUNES, et al., 2013).

A patogênese do dano cardíaco causado pela infecção é complexa e não completamente entendida. Quatro possíveis mecanismos têm sido sugeridos: despopulação cardíaca neuronal parassimpática, injúria cardíaca mediada pela imunidade, anormalidades microvasculares causando isquemia do miocárdio e persistência parasitária no tecido cardíaco com estimulação antigênica secundária (MARIN-NETO, et al., 2007; ANDRADE, et al., 2011; PEREIRA NUNES, et al., 2013).

O dano no tecido cardíaco devido à persistência dos parasitos ao longo da infecção crônica é considerado o mais importante mecanismo no desenvolvimento da cardiomiopatia (BELLOTTI, et al., 1996; SABINO, et al., 2015). Estudos em humanos e animais tem identificado antígenos ou material genômico de *T. cruzi* em focos inflamatórios cardíacos (FRANCO, 1990; HIGUCHI, et al., 1993; JONES, et al., 1993). Além disso, estudos demonstram que a redução ou o aumento da carga parasitária está relacionado com a atenuação ou a exacerbação da cardiomiopatia, sugerindo que a persistência do parasito é importante na CCC (GARCIA, et al., 2005; HEALY, et al., 2015). Os mecanismos pelos quais os parasitos persistem no tecido cardíaco é pobremente entendido, mas a contínua estimulação antigênica e a inflamação têm sido sugeridas (HARMS; FELDMEIER, 2005; HEALY, et al., 2015).

1.4 Interação entre *T. cruzi* e a célula hospedeira

A adesão às células hospedeiras é o primeiro passo para a invasão do *T. cruzi*. Glicoproteínas de superfície com propriedades de adesão celular estão presentes em tripomastigotas metacíclicos, tais como gp90, gp82, gp30 e gp35/50, as quais são diferencialmente expressas nas diversas linhagens (YOSHIDA, 2006).

A gp82 pertence à superfamília das trans-sialidasas/gp85 e está presente especificamente na superfície de tripomastigotas (ARAYA, et al., 1994). Diversas evidências indicam que a gp82 está ativa em cepas de *T. cruzi* altamente infectivas durante o processo de invasão nas células hospedeiras. Estas moléculas ligam-se a células alvo e ativam vias de sinalização intracelular provocando a mobilização de Ca⁺, que vai resultar na internalização do parasito. Este processo ocorre por meio da ruptura do citoesqueleto de actina dependente de Ca⁺ e da mobilização de lisossomos que culmina em exocitose (MARTINS, et al., 2011). A gp30 é expressa em cepas deficientes em gp82, mas atua de forma semelhante. Assim, acredita-se que estas duas glicoproteínas sejam reconhecidas pelo mesmo receptor (CORTEZ, et al., 2012).

Por outro lado, a expressão de gp90 funciona como um regulador negativo da infectividade do parasito. A expressão de altos níveis de gp90 está invariavelmente associada a redução da capacidade de invadir células do hospedeiro. Ao contrário da gp82 e gp30, a gp90 não culmina na mobilização de Ca⁺ intracelular após sua ligação na célula alvo (RUIZ, et al., 1998).

A molécula de superfície gp35/50 expressa por cepas de *T. cruzi* com baixa virulência, são glicoproteínas semelhantes a mucinas, altamente glicolisadas, enriquecidas em ácido siálico e resíduos de galactose, que interagem com as células através dos resíduos de carboidratos. (MORTARA, et al., 1992). A ligação da gp35/50 à célula hospedeira provoca a mobilização de Ca⁺ intracelular, mas de forma bem menor do que ocorre na ligação das gp82 e 30. Assim, gp35/50 medeia a invasão pelo recrutamento de F-actina (FERREIRA, et al., 2006).

Após a invasão da célula hospedeira, os tripomastigotas ficam internalizados em compartimentos ligados a membrana, conhecidos como vacúolos parasitóforos (VP), dos quais eles escapam e se transformam em amastigotas. O mecanismo principal pelo qual os parasitos rompem o VP, envolve a TC-TOX, uma hemolisina com ação lítica, secretada pelo parasito e ativada em pH baixo (ANDREWS; WHITLOW, 1989). Além da TC-TOX, evidências apontam outra molécula de superfície secretada pelo parasito, a enzima neuraminidase/trans-sialidade (TS) também participa do processo de rompimento dos VPs pela ação direta em proteínas lisossomais (LAMPs) (HALL, et al., 1992).

Após aproximadamente 6 ciclos de replicação binária no citoplasma, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos e são liberados, quando ocorre a ruptura da membrana celular, disseminando a infecção (FERNANDES; ANDREWS, 2012). Existem ainda outras diversas moléculas secretadas pelo parasito no ambiente intracelular, com funções as quais permanecem pouco entendidas (MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012).

A partir dessas informações é possível entender que existe uma íntima interação entre o parasito e a célula hospedeira e, ainda, a importância de estudar estes mecanismos específicos no contexto do desenvolvimento da doença de Chagas.

1.5 Resposta imune na infecção por *T. cruzi*

Uma vez que os tripomastigotas metacíclicos penetram no hospedeiro vertebrado através da mucosa ou de lesões na pele, eles encontram células teciduais e da resposta imune residentes no tecido (PADILLA; SIMPSON; TARLETON, 2009). *T. cruzi* pode invadir ativamente uma ampla variedade de células não fagocíticas profissionais por meio de dois diferentes mecanismos. A primeira estratégia, que ocorre em cerca de 20-30% dos casos ocorre através de uma rota dependente de lisossomos, na qual induz a sinalização de Ca⁺, seguida do recrutamento e fusão com lisossomos da célula hospedeira pelo sítio de entrada do parasito (WOOLSEY, et al., 2003; ANDRADE; ANDREWS, 2004). A segunda via, a qual ocorre em 70-80% dos casos, ocorre via invaginação da membrana plasmática, seguida pela fusão com lisossomos intracelulares (WOOLSEY, et al., 2003; ANDRADE; ANDREWS, 2004).

T. cruzi também pode ser passivamente internalizado por células fagocíticas. Macrófagos residentes no sítio da infecção são os primeiros fagócitos profissionais a serem invadidos por *T. cruzi* (BURLEIGH; ANDREWS, 1995). Para estabelecer uma infecção nestas células, o parasito deve suportar um ambiente extremamente oxidativo dentro dos fagolisossomos (PIACENZA, et al., 2013). Assim, o parasito possui uma rede complexa de enzimas antioxidantes, tais como peroxidases e superóxido dismutase (SODs) que podem protegê-lo das ações líticas (PIACENZA, et al., 2009).

Independente da forma de entrada, a fusão lisossomal é essencial para a retenção da alta mobilidade parasitária. Por outro lado, o parasito escapa do ambiente extracelular, o qual possui menor possibilidade de sobrevivência (ANDRADE; ANDREWS, 2005). Adicionalmente, a acidificação lisossomal contribui para a diferenciação das formas tripomastigotas para amastigotas, que se replicam no citoplasma (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Durante a fagocitose, os tripomastigotas desencadeiam a ativação da NADPH oxidase associada a membrana dos endossomos, da célula hospedeira, contendo parasitos, resultando

em contínua produção de radicais superóxido (ânions O_2^-), os quais podem ser convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PIACENZA, et al., 2013). Durante a infecção por *T. cruzi*, espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas como consequência de reações citotóxicas mediadas pela imunidade. Além disso, ocorrem danos secundários a mitocôndrias e destruição tecidual causados pelo parasito (GUPTA; WEN; GARG, 2009).

Citocinas pró-inflamatórias ($IFN-\gamma$ e TNF) também são secretadas pelas células fagocíticas, durante a fase aguda da infecção. Estas citocinas induzem macrófagos infectados a produzir uma grande quantidade de óxido nítrico (NO) via atividade enzimática da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual oxida L-arginina e transfere elétrons da NADPH (GUPTA; WEN; GARG, 2009). NO afeta a sobrevivência dos parasitos por meio de modificações químicas provocadas em proteínas contendo cisteína, e em metaloproteinases do parasito (GUTIERREZ, et al., 2009).

Uma vez gerado, NO pode reagir com O_2^- e produzir peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente oxidante considerado altamente citotóxico e efetivo contra *T. cruzi* (RADI, 2013; ALVAREZ, et al., 2011). Peroxinitrito pode danificar diretamente as células infectadas pela peroxidação de lipídios (prejudicando a integridade da membrana e a função das proteínas), bem como, a função mitocondrial, podendo resultar em apoptose e necrose secundária (RADI, 2013). Além disso, os radicais livres intermediários secundários produzidos a partir de $ONOO^-$, como os radicais hidroxila ($\bullet OH$), dióxido de nitrogênio ($\bullet NO_2$) e carbonato (CO_3^-), podem participar na oxidação e nitração de proteínas, lipídios, e DNA levando a mutações e erros na transcrição (PIACENZA, et al., 2013; RADI, 2013). Assim, o estresse oxidativo causado pela produção do NO também pode ser prejudicial para o hospedeiro, devido ao seu alto potencial de dano tecidual (GUTIERREZ, et al., 2009).

Por outro lado, o complexo de antioxidantes do parasito consiste em várias enzimas e moléculas não enzimáticas. *T. cruzi* possui um sistema de desintoxicação via tripanotona ditiol $T(SH)_2$ e a triparedoxina (TXN) que combatem a ação do sistema NADPH oxidase da célula hospedeira (PIACENZA, et al., 2013). Além disso, o parasito expressa cinco peroxidases operando no sistema de desintoxicação de peróxidos. A triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPX) e mitocondrial (TcMPX), com capacidade de neutralizar peroxinitrito endógeno e derivado de macrófagos e H_2O_2 . A peroxidase heme dependente de ascorbato (TcAPX) confere resistência a H_2O_2 . E ainda, as glutatonas peroxidases I (TcGPXI) e II (TcPGXII) conferem resistência contra hidroperóxidos. Adicionalmente, o parasito também contém 4 SODs de ferro, que protegem o parasito dos efeitos citotóxicos gerados pelo O_2 . TcSODs A e C neutralizam o O_2 produzido na mitocôndria, TcSOD B1 no citosol e TcSOD B1-2 nos glicossomos (PIACENZA, et al., 2008).

Além do estresse oxidativo nos macrófagos, os receptores de reconhecimento padrão (PPRs) são descritos como um dos primeiros mecanismos de defesa contra patógenos, incluindo os protozoários (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). PPRs são expressos por células da resposta imune inata e são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas amplamente compartilhadas pelos patógenos, que coletivamente são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (STAHL, et al., 2013).

Receptores do tipo *toll* (TLRs) estão entre os PPRs e reconhecem PAMPs localizados na superfície celular ou em vesículas intracelulares, como endossomos e lisossomos. Estes receptores são abundantes em células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas, mas também estão presentes em linfócitos T e algumas células somáticas (STAHL, et al., 2013). TLRs ativados levam à produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que por sua vez, recrutam células fagocíticas para o tecido infectado, as quais são importantes não apenas no controle inicial da infecção, mas também na modulação subsequente da resposta imune adaptativa (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Após estimulação, estes receptores sofrem mudanças conformacionais e recrutam moléculas adaptadoras, as quais levam a uma cascata de sinalização dependente de MyD88, culminando na produção de citocinas pro inflamatórias (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Assim, TLRs tem um papel crítico na resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*. A suscetibilidade do parasito está associada à produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ , as quais dirigem a resposta imune protetiva, com perfil Th1 (CAMPOS, et al., 2004). *T. cruzi* apresenta diversas moléculas que podem estimular fortemente os TLRs, como as mucinas e glicoinositolfosfolípídeos de membrana, bem como sequencias de DNA e RNA (OLIVEIRA, et al., 2004).

Outro grupo de receptores da resposta imune inata importantes no controle da infecção por *T. cruzi* são os receptores do tipo *Nod* (NLRs). Estes receptores estão localizados no citoplasma ou associados a membrana plasmática. NLRs estão envolvidos na ativação de MAP quinases, NF-kB e produção de inflamassomas dependentes de capase-1 (GEDDES; MAGALHÃES; GIRARDIN, 2009). Estudo demonstra que camundongos deficientes para o receptor NOD1, infectados com *T. cruzi*, falham em produzir NO quando estimulados por IFN- γ , apresentam alta parasitemia e morrem 24 horas após infecção (SILVA, et al., 2010). Embora os NLRs sejam importantes no controle da infecção por *T. cruzi*, os mecanismos envolvidos ainda permanecem, parcialmente, desconhecidos (CARDOSO; CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Após o primeiro ciclo de replicação intracelular e ruptura da célula hospedeira, *T. cruzi* atinge a corrente sanguínea e se torna alvo das vias complemento. O sistema complemento

consiste em proteínas solúveis que interagem com as estruturas do patógeno e ativam uma cascata de proteases que eliminam os microrganismos. Existem 3 vias do complemento: via clássica, alternativa e da lectina. Embora as vias diferem umas das outras nas etapas iniciais de suas respectivas cascatas, todas convergem para produzir a convertase C3 e, em seguida a C5 levando à formação do complexo de ataque a membrana (MAC) e lise do patógeno (CARDOSO; CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Entretanto, para escapar da lise mediada pelo complemento, *T. cruzi* conta com uma variedade de moléculas que atuam bloqueando a formação da C3 convertase ou neutralizando as etapas iniciais das vias do complemento (OSORIO, et al., 2012; CESTARI, et al., 2013).

Após vários ciclos de infecção e replicação, uma resposta imune robusta contra *T. cruzi* é desenvolvida. Entretanto, essa resposta é incapaz de promover a completa eliminação do parasito. Acredita-se que a incapacidade de eliminar o parasito está relacionada ao enorme polimorfismo de proteínas de superfície imunogênicas, que são coexpressas pelo parasito ao longo da infecção. Este arsenal de antígenos pode fornecer mecanismos para *T. cruzi* evadir da resposta imune (TARLETON, 2015).

A variação antigênica clássica é obtida pela expressão de variantes antigênicas idênticas na superfície da maior parte da população de parasitos, enquanto um pequeno subconjunto expressa diferentes variantes (GUIZZETTI; SCHERF, 2013). A resposta imune atinge os parasitos que expressam a variante comum, mas não identifica aqueles que expressam variantes raras. Assim, na infecção a longo prazo há variação dos antígenos expressos, levando a ondas sucessivas de parasitemia e depuração à medida que novos determinantes antigênicos se espalham na população de parasitos. Porém, não há evidências de que o *T. cruzi* adote esse tipo de variação antigênica (MCCULLOCH; HORN, 2009).

Em vez disso, toda a população de *T. cruzi* expõe simultaneamente uma variedade de proteínas antigênicas de superfície, como mucinas, trans-sialidades, codificadas por famílias multigênicas altamente polimórficas (TARLETON, 2015). A coexpressão deste repertório antigênico leva o sistema imunológico a uma série de respostas de anticorpos não neutralizantes, um mecanismo chamado de cortina de fumaça, que retarda a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* de alta afinidade e o *priming* eficaz das células TCD8⁺ (PITCOVSKY, et al., 2002; TARLETON, 2015).

Além da alta variabilidade de antígenos, a presença de mitógenos de células B derivados dos parasitos, também leva a ativação de células B policlonais, resultando em uma resposta tardia. Essa resposta desfocada é importante para a sobrevivência do parasito, pois a maioria dos anticorpos produzidos durante a fase inicial não visam o parasito, e os anticorpos específicos contra *T. cruzi* são produzidos tardiamente (BERMEJO, et al., 2011). Embora a

ativação policlonal das células B seja transitória, é considerada uma estratégia para a sobrevivência dos parasitos, contribuindo para a cronificação da infecção (CARDOSO; CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Antígenos do *T. cruzi* liberados no ambiente intracelular tornam-se disponíveis para a apresentação antigênica via complexo de histocompatibilidade principal I (MHC I), por meio da via endógena (JUNQUEIRA, et al., 2010). Esta apresentação promove forte, porém tardia, resposta de células CD8+, altamente eficaz no controle dos níveis de parasitos. Entretanto, este evento ocorre após 5-6 dias de infecção, coincidindo com o ciclo de replicação. Este atraso na resposta imune acontece devido a necessidade de um número suficiente de amastigotas produzindo antígenos que se acumulam no citosol. Ou ainda, pela grande variedade de antígenos polimórficos simultaneamente expressos pelo parasito, competindo pela ligação as moléculas de MHC I que impede a resposta imunológica rápida (ALVAREZ, et al., 2008).

A fase inicial imunologicamente silenciosa, permite que o parasito atinja um nível de infecção crítica, antes de ativar o sistema imune, dificultando o controle do parasito durante esta fase. A medida que a infecção avança, as células T específicas reconhecem, preferencialmente, um pequeno número de epítomos, em um processo conhecido como imunodominância (TARLETON, 2015). Antígenos imunodominantes são selecionados com base na abundância e afinidade com receptores de células T e MHC. Assim, as trans-sialidases do *T. cruzi* são alvos imunodominantes de células T CD8+, devido sua alta expressão nas formas infectantes, podendo representar mais de 30% de toda a resposta CD8+. Por outro lado, foi demonstrado em um estudo, que a presença de antígenos subdominantes ocorre após a tolerância adquirida sobre os epítomos imunodominantes (MARTIN, et al., 2006; TARLETON, 2015).

Embora a imunodominância seja um fenômeno bem conhecido na infecção por *T. cruzi*, suas implicações diretas na perpetuação da infecção ainda são controversas. Alguns autores afirmam que células T específicas para um antígeno podem impedir o desenvolvimento de uma imunidade eficaz (TZELEPIS, et al., 2008; RODRIGUES, et al., 2009). Enquanto outros argumentam que este mecanismo não é a principal forma de evasão do *T. cruzi* para garantir sua sobrevivência (ROSENBERG; MARTIN; TARLETON, 2010).

1.6 Proteína P21 de *T. cruzi* e seu papel na biologia do parasita

Como vimos anteriormente, *T. cruzi* secreta diferentes proteínas que neutralizam as respostas imunes celulares, bem como permitem que o parasito persista na célula hospedeira. Nesse sentido, em 2009 foi realizado um estudo no qual tinha como objetivo a predição e a caracterização de proteínas secretadas pelo protozoário *T. cruzi*, a partir do genoma do parasito,

por meio da utilização de ferramentas de bioinformática. Para isso, foram analisados sítios de fosforilação, glicosilação e a presença de peptídeo sinal, sendo estas características de possíveis proteínas secretadas pelo parasito (SILVA, et al, 2009). Sendo assim, neste estudo foi identificada uma proteína de 21 kDa (P21), secretada por todas as formas evolutivas do parasito. Sua forma recombinante (rP21) foi produzida pela clonagem da sequência genética proteica, acrescida de seis resíduos de histidina (*tag*), em vetor plasmidial pET-28a (+), amplificada em bactérias *Escherichia coli*, e purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel (SILVA, et al, 2009). Para confirmar a similaridade da proteína recombinante com a proteína nativa, anticorpos anti-rP21 foram produzidos pela imunização de camundongos com a proteína purificada, e posteriormente, foi verificada a marcação da P21 nativa no pellet e o sobrenadante de cultura dos parasitos, por western blotting (SILVA, et al, 2009).

A partir disso, vários trabalhos têm sido desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com o intuito de entender as atividades biológicas da proteína em diferentes contextos, bem como, o papel da proteína P21 na infecção por *T. cruzi*.

A rP21 está envolvida na invasão celular por formas amastigotas e tripomastigotas, e adere à superfície de células HeLa de forma dose-dependente. Em outro ensaio utilizando células HeLa, a adição da proteína recombinante juntamente com os parasitos, provocou aumento na invasão celular de tripomastigotas das cepas G e CL. Em contrapartida, anticorpos policlonais desenvolvidos contra rP21 inibiram a invasão celular pelas formas infectantes *in vitro*, sugerindo a atuação dos anticorpos sobre a proteína nativa, produzida pelo próprio protozoário. (SILVA, et al., 2009).

Outro estudo revelou que a rP21 aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos na presença de partículas de zymosan (glicano presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*), e de diferentes protozoários (*T. cruzi*, *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*). Além disso, foi descrito que a atividade pró fagocítica da rP21 ocorre por um mecanismo dependente da sua ligação ao receptor de quimiocinas CXCR4 e consequente ativação da via de sinalização PI3-quinase. A via de sinalização celular PI3-quinase está envolvida com vários processos celulares como: crescimento, motilidade, sobrevivência, diferenciação, fagocitose e tráfego intracelular. Vimos ainda, que a proteína recombinante foi capaz de aumentar a polimerização do citoesqueleto de actina de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, após 30 minutos de tratamento (RODRIGUES, et al. 2012).

Uma vez que a rP21 é produzida em *Escherichia coli*, foi necessário verificar se o fenótipo observado ocorreu devido a proteína rP21 ou a presença de resíduos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, ensaios de fagocitose com macrófagos peritoneais e zymosan foram repetidos na presença de rP21 e polimixina B, um antibiótico que bloqueia os

efeitos do LPS, ou em macrófagos nocautes para os receptores do tipo Toll-4, conhecidos por detectar LPS e desencadear a ativação celular. Nestas condições, foi visto que independente da polimixina B ou de macrófagos nocautes, a presença da rP21 provocou efeito pró-fagocítico. Assim, este dado confirma que a atividade biológica atribuída à rP21 é mesmo desempenhada pela proteína (RODRIGUES, et al., 2012).

A partir da descoberta da atividade pró fagocítica, o processo de obtenção da rP21 foi revisto. A proteína pode ser encontrada na forma solúvel e, também está presente nos corpos de inclusão. Assim, para aumentar o rendimento proteico do processo, a rP21 presente nos corpos de inclusão foi purificada, renovelada e avaliada quanto a sua conformação e atividade pró fagocítica. Utilizando as técnicas de espectroscopia por ressonância magnética nuclear, que determina propriedades físicas e químicas de átomos ou moléculas, e a técnica de dicroísmo circular, a qual permite analisar a estrutura secundária das proteínas, foi realizada a comparação das estruturas da rP21 solúvel e renovelada. Os resultados demonstraram que ambas as rP21 possuem exatamente a mesma estrutura e são idênticas na conformação. Além disso, nos ensaios de fagocitose a rP21 solúvel e renovelada também apresentaram atividades pró-fagocíticas semelhantes. Este estudo demonstra a estabilidade e a capacidade de renovelamento da rP21, sem alteração das atividades biológicas (DOS SANTOS, et al., 2014).

Como já mencionado anteriormente, *T. cruzi* não possui uma população homogênea, apresentando linhagens que se diferem pelo grau de infectividade. Diante disso, a P21 poderia ser expressa entre as linhagens de forma diferente, interferindo no processo de invasão das cepas nas células hospedeiras. Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi visto que a expressão da P21 é distinta entre as diferentes cepas e formas evolutivas de *T. cruzi*, (FERNANDES, 2013). As formas amastigotas e epimastigotas das cepas CL, RN-19 e Y apresentaram menor expressão dos alelos da P21, em contrapartida, na cepa G estas formas evolutivas demonstraram maior expressão dos alelos da P21. Por outro lado, a cepa G possui características de baixa infectividade *in vivo*, com ausência de parasitemia. Sendo assim, a expressão da P21 parece não estar diretamente relacionada à virulência do parasito (FERNANDES, 2013).

Até então, vimos que a P21 desempenha propriedade pró-fagocítica e induz a polimerização de actina da célula hospedeira, o que hipoteticamente pode garantir ao parasito sua permanência no ambiente intracelular, onde ele pode se esconder da resposta imune humoral e escapar do fagolisossomo, se dividindo e perpetuando a infecção. Para entender melhor os mecanismos desencadeados pela proteína, decidimos investigar, de forma específica, o papel da P21 no processo inflamatório crônico, e na infecção crônica por *T. cruzi*.

1.7 Modelo de estudo para inflamação: implante esponjoso sintético

O processo inflamatório é uma resposta natural proporcionada pelo sistema imune para garantir a integridade do tecido mediante à lesão tecidual, na tentativa de remover o estímulo nocivo e recuperar o tecido lesado. As lesões teciduais podem ser causadas por microrganismos, reações imunológicas e agentes químicos e físicos (CHANDRASEKHARAN; SHARMA-WALIA, 2015). O processo de reparação tecidual envolve a infiltração de diferentes tipos de células, acúmulo de fluidos, produção de mediadores celulares, liberação de enzimas hidrolíticas, proliferação celular e angiogênese. Todos esses processos ocorrem em uma série sequencial e bem ordenada de eventos (SPINAS, et al., 2014; TSOUPTAS; LORDAN; ZABETAKIS, 2018).

A inflamação é subdividida em duas etapas: inflamação aguda e crônica. A inflamação aguda inicia-se rapidamente e possui duração curta, tendo como objetivo disponibilizar as células de defesa para o tecido lesionado. Assim, as principais etapas da inflamação aguda são: vasodilatação, aparecimento de edemas e a migração de leucócitos (HART, 2015). Entretanto, inúmeras variáveis podem modificar os eventos iniciais da resposta inflamatória, como por exemplo, a natureza e a intensidade da infecção, o tecido afetado e ainda a resposta imune do indivíduo. A partir dessas variáveis, a inflamação pode ou não avançar para um cenário de inflamação crônica (CRUVINEL, et al., 2010).

Na maioria das vezes a recuperação dos tecidos lesionados ocorre naturalmente, sem grandes danos ao indivíduo, e sem a necessidade de medicamentos. Por outro lado, numa inflamação prolongada e desregulada, na qual o agente nocivo não é eliminado, o processo inflamatório progride para inflamação crônica, podendo ser altamente prejudicial ao organismo. Os mecanismos desencadeados para destruir o agente invasor e a necrose tecidual pode lesionar o tecido normal. Dessa forma, quando a inflamação não pode ser controlada, ela se torna a causa do desenvolvimento de muitas doenças, como Alzheimer, artrite reumatoide, diabetes, doenças respiratórias, lúpus eritematoso sistêmico e, principalmente, problemas cardiovasculares (ANGELOVICH; HEARPS; JAWOROWSKI, 2015).

As reações vasculares e celulares clássicas da inflamação são desencadeadas por substâncias químicas produzidas pelos diferentes tipos celulares ou derivadas de proteínas plasmáticas, após um estímulo inflamatório (SPINAS, et al., 2014; TSOUPTAS; LORDAN; ZABETAKIS, 2018). Em condições normais, moléculas e células imunológicas circulam livremente pelo sistema sanguíneo. Mas quando ocorre uma lesão tecidual, os agentes da defesa são direcionados para o local da infecção ou lesão, iniciando assim, o processo inflamatório (CRUVINEL, et al., 2010).

A etapa inicial da inflamação consiste na dilatação dos vasos sanguíneos, tornando-os mais permeáveis, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas (albumina e fibrinogênio) e células imunes para o tecido. As principais células de defesa que atuam na resposta inflamatória são os neutrófilos e macrófagos. Essas células atuam como células fagocíticas, removendo os tecidos mortos e mantendo a assepsia do tecido lesionado. Além disso, macrófagos e neutrófilos liberam citocinas, fatores de crescimento e mediadores químicos, que desempenham importante papel no processo de cicatrização (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

Os neutrófilos geralmente, são as primeiras células a chegarem no local da infecção, atraídos por fatores quimiotáticos como CXCL1, que são produzidos por células locais. A principal função dos neutrófilos é remover o agente nocivo. Estas células possuem receptores de membrana para microrganismos e para células teciduais danificadas, promovendo a fagocitose (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Classicamente, a enzima mieloperoxidase (MPO) é produzida pelos neutrófilos, constituindo o principal componente dos grânulos azurófilos, liberados após a ativação destas células (PULLI, et al., 2013).

Os monócitos se infiltram no tecido lesado a favor do gradiente quimiotático e devido a presença de citocinas inflamatórias se diferenciam em macrófagos. Semelhante aos neutrófilos, a principal função dos macrófagos é fagocitar e eliminar células mortas e microrganismos infecciosos (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Entretanto, os macrófagos podem exercer um duplo papel do processo inflamatório a partir da sua variação funcional e fenotípica: por um lado, os macrófagos M1 exercem papel pró-inflamatório, caracterizado pela produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , e mediadores químicos como ROS, que participam da elucidação dos microrganismos; por outro lado, os macrófagos de perfil M2 são as principais células a produzirem mediadores anti-inflamatórios como o TGF- β e fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese da matriz extracelular (LUCAS, et al., 2010; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014; GENSEL; ZHANG, 2015).

De outra forma, a inflamação crônica apresenta longa duração, na qual coexistem os processos de lesão, inflamação e reparo tecidual. De forma característica, na inflamação crônica, predomina a presença de macrófagos e, por conseguinte, linfócitos e plasmócitos. Assim ocorrem os infiltrados inflamatórios crônicos, visíveis em tecidos lesionados. Outra característica marcante na evolução da inflamação crônica é a destruição do tecido funcional e a substituição por tecido fibroso (ANGELOVICH; HEARPS; JAWOROWSKI, 2015).

A fase de proliferação celular é essencial para geral o tecido de reparo. Nesta fase, é importante destacar o papel dos fibroblastos produzindo colágeno. Este componente corresponde ao principal componente da matriz extracelular, responsável pela força e integridade do tecido que irá sustentar uma intrincada rede de capilares, mantendo a base para a formação do tecido de granulação, ao redor do local da lesão (KLINGBERG; HINZ; WHITE, 2013).

Assim, outra etapa importante do processo de reparo tecidual, é a angiogênese. Nesta etapa, novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. O processo de angiogênese ocorre na matriz extracelular, a partir da migração das células endoteliais e, é regulada por fatores pró-angiogênicos (VEGF, TGF- β), e anti-angiogênicos. A angiogênese exerce um papel fundamental na inflamação, possibilitando a formação do tecido de granulação por meio do fornecimento de nutrientes e oxigênio para o tecido em formação. Além disso, a formação dos novos vasos sanguíneos proporciona a interação e a transmigração de células de defesa no local da lesão (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2012).

Para estudar e compreender todas as etapas envolvidas no processo inflamatório, a implantação de matrizes esponjosas sintéticas tem sido utilizada em murinos (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987). A partir desta técnica é possível simular as fases do reparo tecidual através da inserção de um corpo estranho nos animais, a esponja de poliéster. Este modelo consiste na formação de um ambiente de inflamação crônica (de 9 a 14 dias), no qual é possível analisar e caracterizar os componentes envolvidos na formação de um tecido de granulação, tais como: células inflamatórias recrutadas, fluidos (hemoglobina, colágeno solúvel), citocinas (TNF- α , VEGF), quimiocinas (CXCL1, CCL2) e enzimas (mieloperoxidase e N-acetil- β -glucosaminidase) (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987).

Assim, a utilização de implantes permite obter dados quantitativos e qualitativos sobre a presença de mediadores inflamatórios, fibrose, angiogênese, o número e os tipos de células recrutadas e ainda, o efeito sobre todo o processo inflamatório utilizando diferentes tipos de substâncias de interesse. A partir dessas informações, neste estudo apresentaremos dados obtidos utilizando o implante de modelos esponjosos tratados com não com a proteína rP21, com a finalidade de compreender o papel da P21 na inflamação crônica e fazer uma correlação com os dados obtidos na análise do tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi* e tratados ou não com a rP21.

1.8 Principais características de *Leishmania* spp.

Assim como *T. cruzi*, protozoários do gênero *Leishmania*, pertencem à Família Tripanosomatidae e à ordem Kinetoplastea. (SHAW, 2006; WHO, 2015). Assim, diversas

características são compartilhadas entre estes dois grupos de parasitos. Protozoários do gênero *Leishmania* sp. são intracelulares obrigatórios, unicelulares, flagelados e podem causar um complexo de doenças infecciosas conhecidas como leishmanioses, que afetam milhões de pessoas mundialmente. As leishmanioses são consideradas endêmicas em cinco continentes, nas Américas Central e do Sul, bem como na Europa, África e Ásia (ALVAR, et al., 2012). A espécie *L. (L.) amazonensis* é responsável pela leishmaniose cutânea ou mucocutânea, e é endêmica na região de Minas Gerais (BARATA, et al., 2013).

Assim como *T. cruzi*, *Leishmania* spp. possuem uma notável capacidade de evitar a sua destruição em ambientes hostis, encontrados ao longo do seu ciclo de vida, alternando entre duas formas de vida: promastigotas (forma de vida móvel) flagelados encontrados no trato digestório dos flebotomíneos e amastigotas (forma de vida não móvel) que proliferam dentro das células do hospedeiro mamífero. As formas promastigotas podem ser ainda classificadas como promastigotas procíclicos, que representam um estágio proliferativo e não infectivo, localizados no intestino do inseto vetor, ou promastigotas metacíclicos, forma infecciosa e não proliferativa. Estas saem das células epiteliais do intestino e migram para a parte anterior do trato digestório nos insetos vetores (SACKS, 1984; ASSIS, et al., 2011).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp., assim como em *T. cruzi*, é heteroxênico. A infecção do inseto vetor ocorre durante o repasto sanguíneo quando a fêmea hematófaga de flebotomíneos pica um hospedeiro infectado e ingere células contendo as formas amastigotas. Na porção anterior do trato digestório do inseto, ocorre à transformação das formas amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Após o rompimento dessa matriz, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se multiplicam. Em seguida, vão para a região anterior do intestino, onde sofrem a metaciclogênese. Durante esse processo os promastigotas reduzem o tamanho corporal, aumentam o tamanho e o batimento flagelar e se tornam altamente infectivas, sendo denominados promastigotas metacíclicos. As formas metacíclicas migram para a probóscide e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo (MISHRA, et al., 2009).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo infectada, inoculando formas promastigotas metacíclicas. Os promastigotas metacíclicos entram no hospedeiro e atinge a corrente sanguínea, aderindo e invadindo uma gama de tipos celulares. Assim, as formas promastigotas são fagocitadas por células fagocíticas e no interior do vacúolo parasitóforo sofrem diferenciação para a forma amastigota (STUART, et al., 2008). Estas se multiplicam no interior de macrófagos e provocam a lise da célula, liberando os amastigotas, que poderão invadir outras células ou serem sugados por outra fêmea do inseto vetor, completando assim o ciclo de vida desse protozoário (MISHRA, et al., 2009).

Após a entrada das formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, essas aderem e internalizam em uma gama de células (principalmente em neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e fibroblastos) (KAYE; SCOTT, 2011). A adesão do parasito na célula hospedeira ocorre pelo flagelo ou corpo celular e envolve moléculas presentes na sua superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63), que se ligam a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos (receptores do sistema complemento, receptores Fc γ , receptores de Manose e receptores de fibronectina) (SILVA-ALMEIDA; et al., 2010; UNENO; WILSON, 2012). No início da infecção, promastigotas de *Leishmania* são internalizados por macrófagos em fagossomos. Estas estruturas sofrem uma série sequencial de fusões com organelas endocíticas e lisossomos, gerando um compartimento microbicida contendo H⁺-ATPase vacuolar com pH ácido (pH 4.7 -5.2), o vacúolo parasitóforo (VP) (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

De forma semelhante ao *T. cruzi*, *Leishmania* spp. desenvolveram estratégias para sobreviver intracelularmente, e perpetuar a infecção (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997; DERMINE, et al., 2000, MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). Um mecanismo usado por promastigotas para contornar as consequências microbicidas da fagocitose é a inibição da biogênese do fagolisossomo (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997). Formas promastigotas internalizadas em fagossomos interagem com endossomos e lisossomos tardios de forma atrasada, até sua completa transformação em formas amastigotas, as quais são resistentes ao ambiente hidrolítico dos fagolisossomos (GAUR, et. al., 2009; RODRIGUEZ, et al., 2011). Outro mecanismo, consiste na fusão dos fagossomos contendo diferentes amastigotas, formando um enorme VP. Esta fusão permite a diluição das enzimas presentes no fagolisossomo, proporcionando a sobrevivência do parasito (ANTOINE, et al., 1998).

Devido as semelhanças entre *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis* na estrutura do parasito e no processo de infecção da célula hospedeira, decidimos comparar o efeito biológico da P21, produzida exclusivamente por *T. cruzi*, em ambas as infecções, até sua fase crônica, por meio do tratamento com a forma recombinante da proteína.

1.9 Peptídeos e suas aplicações

O *Phage Display*, ou exposição de biomoléculas na superfície de bacteriófagos filamentosos (M13, f1, fd entre outros), desenvolvido por Smith em 1985, foi originalmente utilizado para construir bibliotecas de anticorpos com o propósito de selecionar fagos que se ligavam fortemente em antígenos específicos (SHUKRA, et al., 2014). A exposição em fagos filamentosos é baseada na clonagem de fragmentos de DNA codificantes de milhões de variantes de certos ligantes (BENHAR, 2001), como proteínas, incluindo anticorpos ou peptídeos. As

sequências de DNA de interesse são inseridas em uma determinada localização no genoma dos bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa fusionada a uma das proteínas de superfície do fago (AZZAZY; IGHSMITH, 2002; SHUKRA, et al., 2014). Uma das vantagens da utilização de bacteriófagos M13 é que estes induzem a produção de novas partículas virais sem provocar infecção lítica (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de sequências baseada na afinidade de ligação a uma molécula alvo em um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988). A seleção, ou *biopanning*, é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos ou anticorpos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em suportes sólidos tais como placas de ELISA, microesferas magnéticas ou de afinidade, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O pool de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com sequências específicas contra o alvo (SMITH, 1985; SMITH; PETRENKO, 1997).

Peptídeos selecionados inicialmente por *Phage display* têm sido amplamente utilizados como drogas terapêuticas em aplicações clínicas, tais como endocrinologia, oncologia, urologia e obstetria (VERGOTE et al., 2009). Várias drogas peptídicas já foram aprovadas para utilização ou estão em fase de testes clínicos. Por exemplo, ecallantide, um inibidor altamente potente de caliceína plasmática humana, utilizado no tratamento de angioedema hereditário agudo (GARNOCK-JONES, 2010). O primeiro peptídeo comercializado, Romiplostim, AMG 531/NPlate 1, é um agonista do receptor de trombopoietina utilizado para o tratamento da púrpura trombocitopênica imunológica (SHIMAMOTO, et al., 2012). AMG 386, é um peptídeo neutralizante de angiopoietinas 1 e 2, um outro exemplo em que o peptídeo ativo foi inicialmente obtido por triagem de uma biblioteca de fagos. É utilizado para a prevenção da proliferação exacerbada de células endoteliais e crescimento de tumores e, atualmente, está em fase clínica III (SHIMAMOTO, et al., 2012).

Nesse sentido, em experimentos realizados previamente, nosso grupo de pesquisa utilizou uma biblioteca genômica de fagos que apresentavam uma enorme variedade de peptídeos (na ordem de 10^9) formados por 12 aminoácidos ligados a proteína PIII dos bacteriófagos filamentosos M13. Estes fagos foram selecionados em relação à afinidade a proteína rP21, o que resultou na descoberta de um peptídeo com alta afinidade a rP21, denominado P1.

Posteriormente, ensaios de invasão utilizando mioblastos murinos (linhagem C2C12) e a forma tripomastigota de *T. cruzi* da cepa G pré-tratada com fagos expressando o peptídeo P1

(fago-P1) foram realizados. Os dados destes ensaios demonstraram que o pré-tratamento dos parasitos com o fago-P1 diminuiu a invasão celular, quando comparados com fago expressando um aminoácido irrelevante (MACHADO, 2014). Dessa forma, esses dados indicam uma ação potencialmente inibitória do P1 sobre a P21 nativa. A partir disso, nós sequenciamos o P1 e providenciamos a sua produção sintética. A partir disso, nós sequenciamos o P1 e providenciamos a sua produção sintética, e no presente estudo avaliamos os efeitos deste peptídeo sobre a P21 nativa e recombinante.

2. Justificativa

A doença de Chagas atinge milhares de pessoas, principalmente, nos países em desenvolvimento, devido as complicações cardiovasculares na fase crônica da doença. Sabe-se que o tratamento disponível atualmente só tem eficácia comprovada durante a fase aguda, e que para as grávidas e pessoas com insuficiência renal e hepática, o tratamento pode ser altamente prejudicial. Assim, terapias alternativas para a doença de Chagas têm sido estudadas, no intuito de descobrir drogas mais eficazes e menos tóxicas.

A patologia da doença de Chagas envolve danos aos tecidos infectados e a consequente perda da funcionalidade dos órgãos, ao longo dos anos. Estes danos são, muitas vezes, atribuídos à resposta imune do indivíduo. Entretanto, estudos mais recentes, vêm demonstrando o papel ativo de proteínas secretadas pelo protozoário no microambiente da infecção, na tentativa de elucidar os mecanismos da patologia e promover melhoria terapêutica.

Neste sentido, nosso grupo de pesquisa descobriu uma proteína, denominada P21, exclusivamente expressa por *T. cruzi* e secretada por todas as suas formas evolutivas. Após sua descoberta, vários mecanismos de ação da P21 têm sido elucidados. A P21 induz a polimerização do citoesqueleto de actina e aumenta a atividade pró-fagocítica de macrófagos murinos, de forma dependente da ativação da via de sinalização celular PI3k. A ativação da PI3k está associada a vários processos celulares como: motilidade, diferenciação, sobrevivência, crescimento e fagocitose. Nos estudos envolvendo a P21, demonstramos que a ativação da PI3k ocorre por meio da ligação da proteína a um importante receptor de quimiocinas, o CXCR4. Este receptor tem um papel fundamental nos processos de inflamação e no recrutamento de células para o local da lesão ou infecção. Assim, neste estudo nós propomos investigar o papel da P21 no contexto inflamatório, e posteriormente, no desenvolvimento da infecção crônica experimental em murinos.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

3.1.1 Analisar o papel da proteína P21 em modelo de inflamação experimental *in vivo*;

3.1.2 Compreender o papel espécie específico da P21 na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* em murinos;

3.1.3 Avaliar a atividade inibitória de peptídeo sintético ligante da rP21, *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- ◆ Analisar o processo inflamatório na presença da rP21, por meio da análise da produção de citocinas, quimiotaxia, angiogênese e deposição de colágeno em modelo de inflamação crônica implantado em murinos;
- ◆ Averiguar a estabilidade da proteína rP21 em soro murino;
- ◆ Compreender e comparar o papel da P21 na infecção crônica por *L. amazonensis* ou *T. cruzi* por meio da análise histopatológica, carga parasitária, angiogênese e indução de fibrose;
- ◆ Analisar a ação direta da rP21 na replicação intracelular e no ciclo celular de *L. amazonensis* e *T. cruzi in vitro*;
- ◆ Verificar o potencial imunogênico da proteína rP21 em murinos tratados ao longo de 6 semanas;
- ◆ Avaliar o efeito do peptídeo P1 na polimerização do citoesqueleto de actina, quimiotaxia, angiogênese, invasão e replicação do parasito, *in vitro*, em presença da P21.

4. Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos e local de estudo

Esta pesquisa foi desenvolvida respeitando-se as normas de biossegurança. Para execução dos experimentos descritos no presente trabalho envolvendo a utilização de animais, 2 projetos foram submetidos à Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade

Federal de Uberlândia (CEUA). A aprovação dos projetos (Protocolos nº 105/10 e nº 077/14) seguem em Anexo.

A parte experimental foi realizada no Laboratório de Tripanosomatídeos, Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado no bloco 2B, sala 200.

4.2 Animais

Camundongos *Mus musculus*, das linhagens C57BL/6 e BALB/c, foram cuidados, manipulados e eutanasiados conforme normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Os camundongos foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA-UFU) em condições padrão de luz-escuro, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ração e água *ad libitum*.

As linhagens foram utilizadas nos diferentes ensaios com o propósito de explorar as características da polarização da resposta imune adaptativa destes camundongos. A linhagem C57BL/6 polariza sua resposta imune para um perfil de resposta Th1, ou seja, resistente a infecção por parasitos intracelulares. Já a linhagem BALB/c polariza a resposta imune para o perfil Th2, considerado, portanto, mais suscetível as infecções intracelulares.

4.3 Parasitos e células

Células VERO (Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ), derivadas de rim de macaco verde da África, macrófagos imortalizados provenientes de medula óssea de camundongos C57BL/6 (iMo) e células t-END, derivadas de hemangioma tímico murino, foram mantidos em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* HIMEDIA (DMEM), suplementado com soro bovino fetal (SFB) 10% (Cultilab), 100mg de gentamicina/mL (AMRESCO) e incubados em estufa a 37°C e 5% CO_2 .

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivados em meio *Brain Heart Infusion Broth* HIMEDIA (BHI) suplementado com SFB 10%, 100mg de gentamicina/mL e 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies, de Nova York, EUA), a 26°C . Parasitos em fase estacionária (promastigotas metacíclicos, formas infectivas) foram utilizados na infecção experimental e parasitos na fase log (replicação) foram utilizados nos ensaios de ciclo celular.

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Cepa G ou Y) foram mantidos em células VERO, em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* HIMEDIA (DMEM), suplementado com SFB (10%), antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L) e incubados em estufa a 37°C , atmosfera úmida e 5% CO_2 . Formas

epimastigotas foram mantidas em *Liver Infusion Triptose Medium* (LIT) pH 7,2, suplementado com SBF e antibióticos citados acima. Esta forma evolutiva, foi utilizada nos ensaios de ciclo celular.

Nos ensaios que avaliaram a atividade da P21 sobre a infecção crônica por *T. cruzi*, utilizamos a cepa Y, que expressa baixa quantidade de proteína P21. Entretanto, nos ensaios utilizando o peptídeo ligante da P21 (P1), utilizamos a cepa G, que expressa grande quantidade de proteína nativa, na tentativa de inibi-la.

4.4 Purificação da proteína rP21 e do extrato bacteriano

A obtenção da P21 recombinante foi realizada como previamente descrito (SILVA, et al., 2009; DOS SANTOS, et al., 2014) (**Figura 3**). Para demonstrar que os efeitos observados ao longo deste estudo não foram provenientes de contaminações durante o processo de purificação, um extrato bacteriano (*E. coli*) foi obtido utilizando minuciosamente o mesmo protocolo de obtenção da proteína recombinante, exceto pela ausência de bactérias *E. coli* contendo vetor plasmidial específico da P21. Um gel de poliacrilamida 12 % demonstrando o perfil de bandas de E.B e rP21 foi realizado e o resultado pode ser visualizado na (**Figura 6 A**).

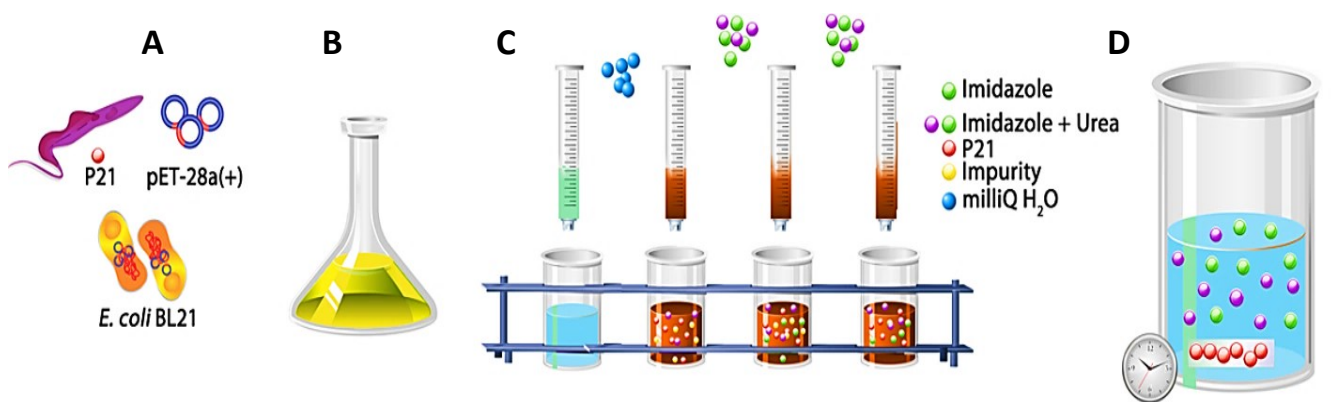


Figura 3. Esquema do processo de purificação da proteína rP21. A. Obtenção da proteína a partir da inserção de clones do gene da P21 em bactérias *E. coli*; **B.** Crescimento e lise das bactérias; **C.** Corpos de inclusão incubados em uma coluna de níquel, lavagens e eluição. **D.** Diálise em PBS durante 48 horas. SANTOS, et al.,2014.

4.5 Modelo Experimental de Inflamação

Discos esponjosos de poliéster com 1,2 cm de diâmetro (VitaFoam Ltda) foram mantidos em álcool 70% v/v durante 24 horas e, posteriormente, fervidos em água destilada por 30 minutos para esterilização prévia à implantação (ANDRADE, et al., 1987).

Camundongos C57BL/6 foram randomicamente separados em 3 grupos contendo 10 animais cada, para análises bioquímicas e histológicas (5 animais para cada tipo de análise), tratados ou não com rP21. Para o implante dos discos esponjosos, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal, com Xilasina-Cetamina (Syntec) (60mg-4mg/kg), submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Após isso, os animais foram dispostos em mesa cirúrgica, uma incisão mediana dorsal de aproximadamente 10 mm e a divulsão do tecido subcutâneo na direção craniana foram realizadas. O disco foi implantado na região interescapular e a sutura da incisão realizada com fio 25 nylon 3.0 usando ponto Donati. Após recuperação da anestesia os animais foram alocados em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum* (ANDRADE, et al., 1987).

Os camundongos foram tratados a cada 72 horas, durante 9 dias (fase crônica do processo inflamatório,) com 20 μ L de PBS, rP21 (40 μ g/mL) ou extrato bacteriano (40 μ g/mL) por meio de injeções *in situ* (esponja). Para remoção dos implantes, os animais foram submetidos à eutanásia por injeção contendo tiopental (Thiopentax) (30mg/kg) e os discos foram dissecados, pesados e processados para análises bioquímicas e histológica.

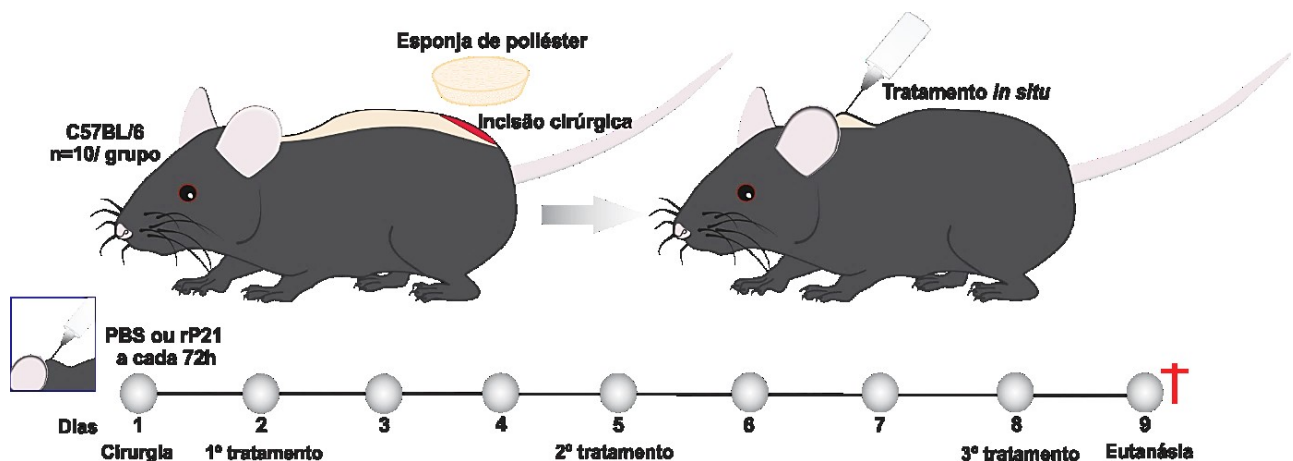


Figura 4. Esquema do implante da esponja de poliéster (modelo de inflamação crônica) em camundongos C57BL/6 e da cinética de tratamento. Camundongos C57BL/6, foram anestesiados e um implante de esponja de poliéster foi inserido cirurgicamente. Durante 9 dias os camundongos foram tratados com PBS, rP21 ou E.B. a cada 72 horas *in situ*. Após esse período, os camundongos foram eutanasiados e a capsula formada ao redor da esponja de poliéster foi cuidadosamente retirada para diferentes análises. Figura de TEIXEIRA, L.T.

4.6 Análises bioquímicas

Para avaliar a atividade angiogênica e quimiotática da rP21 no processo inflamatório, os discos esponjoso foram divididos em 2 partes, pesados e submetidos a dosagens de hemoglobina, mieloperoxidase (MPO), N-acetil- β -d-glucosaminidase (NAG) e das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-4.

A dosagem do conteúdo de hemoglobina no implante foi realizada pelo método do reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado por Plunkett e Hailey (1990) e Hu et al., (1995). Os implantes foram homogeneizados (Tekmar TR-10, Ohio, USA) em 2 mL de reagente cromogênico (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest). Após, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante filtrado em filtros de 0,22 µm (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica a 540 nm. A concentração de hemoglobina presente em cada amostra foi calculada a partir de uma curva-padrão conhecida e os resultados foram expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido do implante.

Após a determinação do conteúdo de hemoglobina, ao sobrenadante foi adicionado coquetel inibidor de protease (1:100/Sigma) para dosagem de citocinas. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 5,4) e homogeneizados. O volume de 300 µL foi transferido para microtubo e acrescentados 600 µL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB/ Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato (pH 5,4). Após, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para dosagem. A reação enzimática da atividade de MPO foi realizada adicionando 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003%, 100 µL de TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetilsulfóxido – Merck), 200 µL do sobrenadante da amostra e após por 1 minuto, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄/Merck) a 4M. Em seguida, foram adicionados 200 µL/ poço em placa de 96 poços para leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de MPO (absorbância/mg de peso úmido do implante).

Para dosagem de NAG o sobrenadante da segunda parte da esponja foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1%, gelado. As amostras foram homogeneizadas e centrifugada em 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado. Foram adicionados 100µL das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços e 100µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-d-glucosamina – Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5). A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e após, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M (pH 10,6). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 400 nm. A concentração de NAG nos implantes foi calculada a partir de uma curva-padrão de *p*-nitrofenol com concentrações conhecidas. O *p*-nitrofenol é o produto cromógeno da reação entre *p*-nitrofenol-N-acetil-β-D-glucosamina com a N-acetil-β-d-glucosaminidase (NAG). Os resultados foram expressos em nmol mL⁻¹/mg de peso úmido das esponjas.

O sobrenadante obtido após a dosagem de hemoglobina, foi utilizado para dosagens das citocinas IL-1 β (cat. 559603), TNF- α (cat. 555628) e IL-4 (cat. 555232) por ELISA utilizando kits da BD, de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 Perfil inflamatório e contagem de vasos

Esponjas submetidas a análise histológica foram fixadas com fixador Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas a 4°C. Depois, as esponjas foram incubadas em álcool etílico PA por 30 minutos e 4 lavagens com xilol seguido de 30 minutos de incubação e, finalmente, incluídas em parafina. Os cortes foram corados com eosina/hematoxilina ou azul de toluidina. Imagens dos cortes foram obtidas em câmera e software LasEz acoplada em microscópio de luz Leica DM500. O tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório foram determinados pela presença ou ausência de (i) intensidade da resposta inflamatória, (ii) neutrófilos, (iii) macrófagos, (iv) linfócitos, (v) plasmócitos, (vi) necrose. As características foram medidas pela intensidade (-) ausente, (+) leve, (++) moderado e (+++) intenso.

Para determinar o impacto na presença de rP21 na angiogênese, toda a extensão de 2 cortes/animal, em diferentes profundidades, foi analisada por meio da contagem dos vasos sanguíneos. Para determinar a quantidade de mastócitos ativados, toda a extensão de 1 corte/animal foi analisada, por meio da contagem de mastócitos degranulados corados pelo azul de toluidina. E, para determinar a angiogênese no processo inflamatório, os vasos sanguíneos foram contados em toda a extensão dos cortes histológicos (2 cortes/ animal).

4.8 Teste de estabilidade da rP21 em soro murino

Para verificar se a rP21 poderia ser degradada quando em presença de soro murino e, por conseguinte poderia ser utilizada no tratamento dos animais, 10 μ g de proteína recombinante foi incubada com soro de camundongos não imunes por 24 horas. Após este período, a solução foi submetida em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE).

De forma semelhante, para testar a estabilidade da atividade biológica da rP21, macrófagos imortalizados derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram plaqueados (2×10^5 células/poço) em placas de 12 poços contendo lamínulas circulares de vidro de 13 mm, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ *overnight*. Posteriormente, as células foram incubadas com soro + rP21 (incubadas por 24 horas previamente ao ensaio) e partículas de Zymosan (20 partículas/célula). Após o tempo de 2 horas, as células foram fixadas com solução de Bouin (HT10132/ Sigma Aldrich) e coradas com Giemsa (GS500/ Sigma Aldrich)

de acordo com as instruções do fabricante. O número de partículas internalizadas nos macrófagos foram quantificadas pela contagem de 200 células/lamínula, em triplicata.

Além disso, camundongos BALB/c (n=5/ grupo) foram tratados por via subcutânea com 40 µL de rP21 (1µg/µL) ou PBS e após 72 horas o soro foi obtido e analisado por ELISA para a presença da rP21. Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / cut \text{ off}$, onde *cut-off* foi estabelecido como a média da DO de três controles negativos acrescida de dois desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quanto Índice ELISA > 1.

4.9 Infecção experimental com *T. cruzi* ou *L. amazonensis* in vivo

Camundongos BALB/c foram infectados, por via subcutânea nas patas traseiras, com 1×10^6 tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y/animal ou 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) amazonensis*/ animal. Após a infecção, os camundongos foram randomicamente divididos em 3 grupos (n=10/ grupo): (1) infectados com *L. (L.) amazonensis*, (2) infectados com *T. cruzi* e (3) não infectados. Cada um dos grupos foi dividido em outros 2 subgrupos (n=5/grupo): (1) PBS, (2) rP21. Durante 6 semanas, os camundongos foram tratados por via subcutânea a cada 72 horas com 40µL de solução de rP21 (1µg/µL) diluída em PBS ou 40µL de PBS. As patas direitas foram medidas uma vez por semana utilizando paquímetro digital (ZAAS-PAQ-DIGITAL) e após 6 semanas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, e os linfonodos, coração, baço e patas foram coletados e processados para diferentes análises.

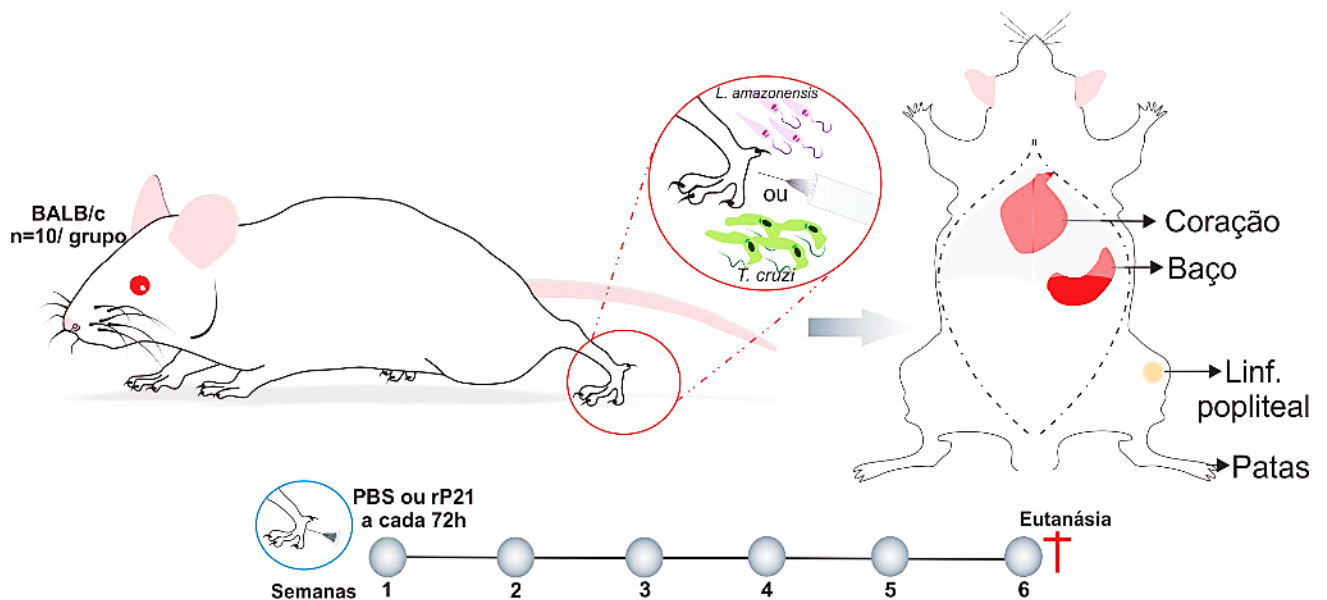


Figura 5. Esquema da infecção experimental com *T. cruzi* / *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e da cinética de tratamentos. Camundongos BALB/c foram infectados com *T. cruzi* ou *L. amazonensis* e tratados com PBS ou rP21 a cada 72 horas, ao longo de 6 semanas. Após esse período, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos: patas, linfonodos do poplíteo, baço e coração foram coletados para diversas análises. Figura de TEIXEIRA, L.T.

5.0 Análise Histopatológica

Os órgãos (linfonodos, baço, coração e pata) coletados foram fixados em formaldeído (4%), desidratados, diafanizados e embebidos em parafina, cortes em secções de 5 μ m de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), para análise posterior.

A avaliação da resposta tecidual foi baseada em análises qualitativas e semiquantitativas de tecidos infectados e não infectados, por meio da parceria de um patologista, Dr. João Paulo Silva Servato, que atualmente é docente na Universidade de Uberaba. Os tecidos foram submetidos a duas observações independentes para padronização da presença ou ausência de células inflamatórias, e ainda para determinar os tipos de células e a severidade do processo inflamatório.

Os critérios utilizados para análise dos tecidos foram baseados na presença ou ausência de resposta inflamatória, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células gigantes de corpo estranho, necrose, edema, fibroblastos e adipócitos. As características da intensidade foram classificadas: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa. Em adição, cada órgão foi avaliado de acordo com suas características específicas: no tecido esplênico, megacariócitos e centros germinativos foram considerados para avaliação; nos linfonodos, eosinófilos, corpos

apoptóticos, fibrose e centros germinativos foram analisados; e nos tecidos das patas, a fibrose também foi avaliada.

A avaliação da angiogênese nos tecidos foi realizada pela contagem dos vasos sanguíneos de toda a extensão de 2 cortes histológicos/órgão/animal, em diferentes alturas, corados com HE. Para avaliação da deposição de colágeno tecidual, cortes de tecido de pata e coração foram submetidos a sucessivas imersões em xilol, hidratados e marcados com solução de picosirius red. Posteriormente, os cortes foram contra corados com solução de hematoxilina, lavados e incubados com eosina aquosa. Por fim, foram desidratados, diafanizados e as lâminas foram montadas utilizando Entellan (107960- Merck Millipore). Para cada corte 20 imagens foram obtidas em microscópio (Nikon) com câmera acoplada e a quantificação total de fibras colágenas foi determinada utilizando software Image J.

5.1 PCR quantitativo em tempo real

Uma fração dos tecidos de pata e coração foram separados para utilização em PCR. As partes foram pesadas e o DNA foi extraído utilizando o *PureLink Genomic Dna Kit* (K1820-01, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram digeridas com *PureLink Genomic digestion buffer* e proteinase K a 55°C *overnight*. Após, RNase, *PureLink Genomic lysis/binding buffer* e etanol PA foram adicionados. O lisado obtido foi colocado em *PureLink spin column*, lavados e eluídos, com tampões específicos. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-vis).

As reações de qPCR foram preparadas utilizando os oligonucleotídeos: 13A (5'-GGGGTGGAGTCTGGGCGT-3') e 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCGAGTT-3'), os quais resultam na amplificação de fragmento de DNA do cinetoplasto (120 bp) de *Leishmania* sp. como descrito por Rodgers, Popper e Wirth, 1990 ou P21 fw (5'-AACGCCACCATCAATCTTTTG-3') e P21 rv (5'-CGTCGCATTTCCTCATTTCTTC-3'), os quais resultam na amplificação de fragmento de antígeno de *T. cruzi* (65bp), como descrito por Brigido et al., 2016.

Para quantificação da carga parasitária, uma curva padrão com diluições seriadas de DNA de 10^8 parasitos/mL de *T. cruzi* ou *L. amazonensis*, misturados com tecidos de pata e coração não infectados (25mg), foi previamente preparada. A eficiência das curvas foi testada, o *slope* ficou entre 110 e 90% e o valor de R^2 sempre maior ou igual a 0,95.

Para reação de qPCR, 50ng de amostras de DNA, quelante de DNA Power SYBR Green PCR Master Mix reagente (Applied Biosystems) e 10 μ M de cada primer foram utilizados. As reações foram processadas em aparelho termociclador ABI7300 (Applied Biosystems). Os

parâmetros de ciclagem foram como segue: para *T. cruzi* 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos (BRIGIDO, et al., 2016). E, para *L. amazonensis* 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990). Após a elongação final do qPCR, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 para 95°C, com aumento gradual de 0,5 °C/ segundo para obter a temperatura de *melting* e evitar produtos inespecíficos.

5.2 Produção de anticorpos anti-rP21

Camundongos BALB/c foram randomicamente divididos em 2 grupos (n=5/grupo) e tratados a cada 72 horas durante 6 semanas com 40 µL de rP21 (1µg/µL) ou PBS, por via subcutânea. O sangue dos camundongos foi coletado pela artéria do plexo orbital, uma vez por semana, utilizando aplicação previa de anestésico oftalmológico (cloridrato de tetracaína 1%, cloridrato de fenilefrina 0,1%), fornecido pelo biotério-UFU. O soro obtido foi analisado para presença de anticorpos anti-rP21, determinados por ensaio de ELISA. O controle positivo para comparação foi soro de coelho imunizado com rP21 e adjuvante previamente obtido.

5.3 Ensaio de replicação *in vitro*

Macrófagos (iMo) foram plaqueados (1×10^5 células/poço), em lamínulas de vidro de 13 mm contidas em placas de 24 poços, em meio DMEM e incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y ou promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com iMO (5 parasitos/ célula) por 4 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas ou não com rP21 40µg/mL por 72 horas, após esse período, as células foram fixadas com Bouin, coradas com Giemsa e analisadas em microscopia ótica. Para determinação da carga parasitária, foi realizada a contagem de 300 células infectadas por lamínulas, em triplicada e em dois experimentos independentes.

5.4 Análise do ciclo celular de *T. cruzi* e *L. amazonensis* tratados com rP21

Para avaliar a atividade da proteína rP21 sobre o ciclo celular dos protozoários focos do estudo, promastigotas de *L. amazonensis* em fase log (replicação) e epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y foram tratados com a proteína (40µg/mL) e incubados por 72 horas. Após este período, os parasitos foram fixados com etanol 70% gelado e armazenados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os parasitos foram marcados com iodeto de propídio (10 µg/mL) diluído em PBS, na presença de RNase (100 µg/mL), incubados por 45 minutos a 37 °C no escuro, e submetidos a

citometria de fluxo. A análise das amostras foi realizada utilizando o software FlowJo X v.07 (Three Star INc. Ashland, OR, USA). Os ensaios foram realizados contendo 6 replicatas para cada situação, em 2 experimentos independentes.

5.5 Obtenção do peptídeo sintético ligante da rP21 (P1)

O peptídeo utilizado neste estudo foi previamente selecionado utilizando a técnica de *Phage Display*, na qual a proteína rP21 foi imobilizada e incubada com uma biblioteca genômica de peptídeos expressos em bacteriófagos M13 (MACHADO, 2014). Posteriormente, o peptídeo ligante da rP21 escolhido, denominado P1, foi sequenciado e produzido na forma sintética. Um peptídeo modificado (troca de aminoácidos e posição dos mesmos) (P1S), incapaz de se ligar a rP21, também foi obtido para ser utilizado como controle nos ensaios. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa FastBio (<http://www.fastbio.com.br/>).

5.6 Viabilidade celular

Primeiramente, para garantir que os resultados obtidos não fossem consequência de alterações na viabilidade celular das diferentes linhagens utilizadas (iMO, tEND e parasitos) estas foram submetidas ao tratamento com P1 ou P1S (100µg/mL) na presença ou não de rP21 (40µg/mL) por 72 horas. Após esse período, a resazurina (coloração roxo escuro) foi adicionada e as células foram incubadas por 18 horas, tempo necessário para metabolização do composto e formação da resofurina (coloração rosa fluorescente). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 594 nm e os dados obtidos foram analisados utilizando o software Graphpad Prism v 6.01 e expressos em porcentagem de viabilidade mitocondrial, comparadas ao controle não tratado (viabilidade 100%).

5.7 Imunofluorescência indireta

Para analisar a interferência dos peptídeos sintéticos na polimerização de actina celular, macrófagos de linhagem (iMo) na quantidade de 10^6 células/grupo foram incubados, em tubos para citometria de fluxo, com P1 ou P1S na presença ou não de rP21 ou ainda, apenas em meio DMEM, sem tratamento. Após o tempo de 1 hora, as células foram lavadas com PBS, fixadas em formaldeído 4%. Após a lavagem, as células foram marcadas com faloidina (P1951- Sigma Aldrich) na proporção de 1:1000 e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta e software ZEN 2009 Light edition.

5.8 Quimiotaxia *in vitro* na presença de rP21, P1 e P1S

O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizada por meio do sistema de *transwell* com poros de 8µm (*Chemicon Cell Invasion Assay Kit EMD Millipore Corporation Darmstadt*). Macrófagos (iMo) foram plaqueados na parte superior do *transwell*, na quantidade de 10^6 células/poço em meio de cultura livre de SFB. Meio DMEM contendo P1 ou P1S (100 µg/mL) na presença ou não de rP21 (40 µg/mL) ou apenas DMEM foram adicionados na parte inferior do sistema. As células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as células que migraram para a parte interna da membrana foram coradas com kit panótico e contadas por microscopia ótica.

5.9 Angiogênese

Para avaliar o efeito do P1 sobre a atividade anti-angiogênica da rP21, células endoteliais (derivadas de hemangioma tímico/ tEND) foram plaqueadas (2×10^5 cels/ poço) em solução contendo meio DMEM suplementado com fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (30ng/mL). Placas de 24 poços contendo 250 µL de matrigel (5,25 mg/mL/ BD Bioscience) previamente adicionado foram utilizadas. Após 18 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, imagens de toda a extensão do poço foram adquiridas em microscópio de luz e os vasos formados foram contados (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987; HU, et al., 1995).

6.0 Ensaio de invasão e replicação com peptídeos e rP21

Para os ensaios de invasão, iMo foram plaqueados sobre lamínulas de 13 mm (na ordem de 10^5 células/poço) em placas de 24 poços e submetidos à infecção com formas tripomastigotas (5 parasitos/célula) da cepa Y previamente tratados por uma hora com os peptídeos sintéticos individualmente. Os ensaios foram feitos na presença ou não da rP21. Os parasitas foram incubados por 4 horas, e após este período, os poços foram lavados, e as células foram fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. A contagem dos ensaios de invasão foi realizada contando-se 100 células totais e avaliando a % de invasão e a carga parasitária, em microscópio ótico.

Nos ensaios de replicação, iMo foram também plaqueados sobre lamínulas de 13mm, nas mesmas condições descritas acima. Os parasitos foram então adicionados e após 4 horas de invasão, as células foram lavadas para retirada dos parasitos não internalizados e os tratamentos foram adicionados. Durante 72 horas, as células permaneceram incubadas nas condições ideais de cultivo e após este período, foram fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. Os dados dos ensaios de replicação foram obtidos pela contagem de parasitos internalizados em 100 células infectadas (SILVA, et al., 2009).

6.1 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão dos ensaios realizados em triplicada. As diferenças significativas foram determinadas utilizando testes t Student's, Mann-whitney (two-sided), one-way ou two-way ANOVA e testes de múltiplas comparações: Turkey's (amostras paramétricas) ou Dunn's (amostras não paramétricas), de acordo com o design experimental (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

7. Resultados e Discussão

7.1 rP21 aumenta a produção da citocina IL-4 e recruta macrófagos para o local da inflamação

Com o intuito de entender o papel da rP21 no contexto da resposta inflamatória, esponjas de poliéster introduzidas em camundongos C57BL/6 e tratadas *in situ* com PBS, extrato bacteriano (E.B.) ou rP21 (perfil de bandas demonstrado na **Figura 6 A**) foram recuperadas cirurgicamente, após 9 dias. O perfil de citocinas produzidas em cada tratamento foi estudado. Os resultados demonstram que tanto o E.B quanto a rP21 reduziram a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α . Por outro lado, apenas nas esponjas tratadas com rP21 houve aumento da produção de citocina IL-4, conhecida por modular respostas do tipo Th2, com perfil anti-inflamatório (**Figura 6 B-D**).

A geração de conhecimentos sobre a patologia e a resposta imune da infecção por *T. cruzi* tem sido realizada utilizando modelos murinos. Estudos demonstram que as respostas imunes inatas e adaptativas desempenham um papel importante no controle parasitário, dependendo da ação combinada de vários tipos celulares, incluindo NK, CD4+ e CD8+, bem como a produção de anticorpos por linfócitos B. A resistência à infecção por *T. cruzi*, está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias, que ativam a produção de óxido nítrico por macrófagos, o qual é responsável pela eliminação intracelular do parasito. Em contraste, citocinas tais como IL-4 e TGF- β estão associadas à suscetibilidade parasitária (CHOI; REISER, 1998; RODRIGUES, et al., 2012a).

Além disso, autores mostram que a produção de IL-4 reduz a morte de célula B em camundongos infectados com *T. cruzi* e bloqueia a diferenciação em plasmócitos, favorecendo o desenvolvimento de células B de memória, por via dependente da proteína galectina-3 (ACOSTA-RODRÍGUEZ, et al., 2004). Dessa forma, o aumento da secreção de IL-4 após o

tratamento com a proteína rP21 pode ter um impacto na promoção de um ambiente imune adequado para a infecção por *T. cruzi*.

Para melhor compreender a atividade da rP21 sobre o recrutamento de células inflamatórias, fizemos a dosagem bioquímica de duas enzimas: a N-acetil- β -d-glucosaminidase (NAG), enzima presente em lisossomos, produzida principalmente por macrófagos e geralmente utilizada em estudos para detectar acumulação e ativação de macrófago; e a mieloperoxidase (MPO), enzima sintetizada durante a diferenciação mielóide, servindo, geralmente, como indicador de neutrófilos ativados. Inicialmente, nossos dados mostraram que a rP21 aumentou os níveis de MPO, sugerindo recrutamento de neutrófilos, enquanto a produção da enzima NAG se manteve inalterada (**Figura 6 E-F**).

A partir desse resultado, buscamos verificar qual o efeito da proteína sobre o perfil de células inflamatórias encontradas nas esponjas, por meio da análise histológica dos insertos. O processo inflamatório normal esperado nesse modelo envolve aumento da resposta inflamatória geral, recrutamento de neutrófilos, linfócitos, presença de plasmócitos, sem o aparecimento de áreas de necrose tecidual (BAILEY, 1988). Entretanto, nas esponjas tratadas com E.B houve aumento da resposta inflamatória, linfócitos e necrose, o que sugere efeito danoso para o tecido durante a inflamação. Já no grupo tratado com rP21 não houve alterações na resposta inflamatória, houve discreto aumento de necrose e de forma contraditória aos resultados da produção das enzimas NAG e MPO, a proteína recrutou principalmente macrófagos (**Tabela 1**).

A contradição entre o aumento da expressão de MPO, mas não de neutrófilos no infiltrado leucocitário, na presença da rP21, pode ser explicada pela produção desta enzima por macrófagos e linfócitos (SUGIYAMA, et al., 2001). A mieloperoxidase catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrogênio e ânions cloreto e oxida a tirosina em radicais tirosil (TyrO). Esses radicais são citotóxicos para uma variedade de microrganismos. Contudo, MPO liberada no meio extracelular pode causar injúrias teciduais (DE ARAUJO, et al., 2013). Pesquisas relacionadas a aterosclerose humana, uma doença inflamatória crônica intimamente relacionada a doenças cardiovasculares, mostram que o HOCl, derivado da MPO produzida por macrófagos, pode induzir a descamação e a morte de células endoteliais, com estímulo à ativação e agregação plaquetária (SUGIYAMA et al., 2004).

Com uma breve revisão da literatura é crível compreender que o processo inflamatório que caracteriza a CCC é acentuado durante a fase aguda da doença, mas está presente nas formas indeterminada e crônica da doença de Chagas. Assim, embora clinicamente silenciosa, a inflamação está continuamente presente (PEREIRA-BARRETO, et al., 1986; CARRASCO-GUERRA, et al., 1987). Neste contexto, a constante presença de antígenos ou material

genômico de *T. cruzi* nos focos inflamatórios, em diferentes fases da infecção, tem sido verificado (JONES, et al., 1993; BELLOTI, et al., 1996; ZHANG; TARLETON, et al., 1999; PALOMINO; AIELLO; HIGUCHI, 2000; TARLETON, 2001). Estas observações nos fornecem uma base para supor que proteínas secretadas por *T. cruzi*, como potencialmente a P21, desempenham papel no início e na manutenção do processo inflamatório no tecido cardíaco chagásico.

Assim, verificamos ainda, por análise histológica (coloração de azul de toluidina), a quantidade de mastócitos degranulados nas esponjas tratadas com PBS, E.B. e rP21. Os resultados mostram que apenas nos insertos tratados com rP21 houve aumento destas células (**Figura 6 G**). Os mastócitos são células residentes normais da maioria dos órgãos e tecidos, incluindo o coração. Porém, a presença de mastócitos também está implicada em diversas disfunções cardiovasculares, como isquemia, infarto do miocárdio, miocardite, insuficiência cardíaca, doença cardíaca hipertensiva e fibrose relacionada ao transplante (BROWER; JANICKI, 2005; FRANCIS; TANG., 2006). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a presença de mastócitos em tecidos cardíacos infectados por *T. cruzi*. Entretanto, o mecanismo que leva ao aumento da presença de mastócitos nos tecidos infectados não é claro (ALMEIDA; PEREIRA; TAFURI, 1975; POSTAN, et al., 1994; MEUSER-BATISTA, et al., 2008).

É sabido que a IL-4 promove a maturação, sobrevivência, proliferação e migração de mastócitos (OLSSON; TAUB; NILSSON, et al., 2004; KALESNIKOFF; GALLI, 2008). Nesse sentido, o aumento de mastócitos degranulados corrobora com aumento dos níveis de IL-4 também detectados em esponjas tratadas com rP21. Assim acreditamos que a rP21 tem importância na configuração de células recrutadas durante o desenvolvimento da miocardite nos tecidos infectados por *T. cruzi*.

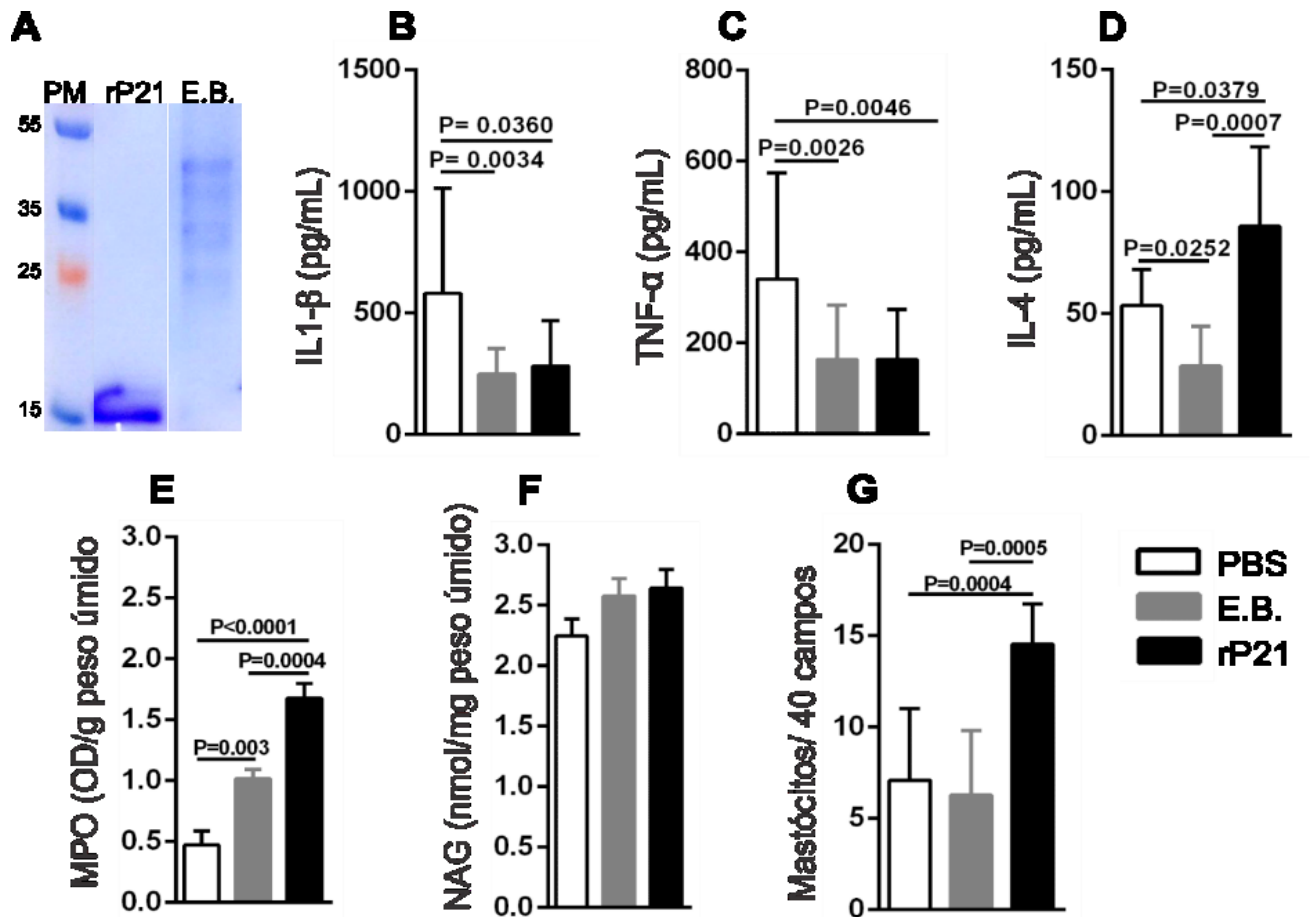


Figura 6. rP21 aumenta a produção de IL-4 e promove a expressão de mieloperoxidase (MPO). A. Gel de poli-acrilamida demonstrando o padrão de bandas da proteína e extrato bacteriano (E.B.) B e C. rP21 e E.B. reduzem a expressão de IL-1 β e TNF- α ; D. E.B. inibe a produção de IL-4, enquanto rP21 aumenta os níveis da citocina; E e F. rP21 induz aumento na produção da enzima mieloperoxidase (MPO), mas não de N-acetil- β -d-glucosaminidase (NAG); G. Alto número de mastócitos foram encontradas nos cortes histológicos (corados com azul de toluidina) tratados com rP21 em comparação a PBS e E.B. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. PM: peso molecular expresso em quilo Dalton (kDa), sendo rP21 = 18kDa.

Tabela 1: Análise do infiltrado inflamatório nos insertos dos diferentes grupos tratados

Critério Histológico	PBS	E.B.	rP21
Resposta Inflamatória	++	+++	++
Neutrófilos	+	+++	+
Macrófagos	++	++	+++
Linfócitos	+++	+++	++
Plasmócitos	++	+	+
Necrose	-	++	+

(-) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) intenso.

7.2 rP21 demonstra atividade anti-angiogênica e induz deposição de colágeno

Com o intuito de observar os efeitos da rP21 sobre a angiogênese, durante o processo inflamatório, nós dosamos o conteúdo de hemoglobina encontrado nas esponjas comparando os diferentes grupos. Os resultados demonstraram que nos insertos tratados com rP21 houve diminuição nos níveis de hemoglobina (**Figura 7 A**). Este dado desencadeou a hipótese de um potencial papel anti-angiogênico da proteína de *T. cruzi*. Com o objetivo de confirmar esta hipótese, nós determinamos o número de vasos sanguíneos presentes em 40 campos de 2 cortes histológicos, em diferentes alturas do implante, por animal. As esponjas tratadas com rP21 apresentaram redução do número de vasos em relação aos controles PBS e E.B. (**Figura 7 B e D**).

O processo de angiogênese pode ser resumido pela degradação da membrana basal, migração celular em direção ao estímulo de crescimento, proliferação e formação do túbulo capilar, seguido de depósito de membrana basal, recrutamento de células acessórias como fibras elásticas (vênulas), ou musculatura contrátil (arteríolas). Anormalidades endoteliais funcionais e estruturais são frequentemente observadas na CCC, culminando em acentuados distúrbios cardiovasculares como: diminuição do fluxo sanguíneo, isquemia focal, aumento da agregação plaquetária e níveis elevados de compostos que induzem a vasoconstrição, como tromboxano A2 e endotelina-1 (ROSSI, 1990; TANOWITZ, et al., 1990; ROSSI; GONÇALVES; RIBEIRO DOS SANTOS, 1994; MARIN-NETO, et al., 2007).

A partir disso, acreditamos que a atividade anti-angiogênica promovida na presença da rP21 pode estar relacionada ao aumento da citocina IL-4 visto anteriormente. Esta citocina faz com que macrófagos locais produzam altos níveis de tirosina quinase 1 solúvel (sFlt-1) e expressem um fenótipo arginase-1+ (M2), resultando na inibição da angiogênese (WU, et al., 2015). Neste contexto, a rP21 poderia impactar na isquemia microvascular, a qual amplifica a inflamação crônica no miocárdio durante a CCC.

Por outro lado, é sabido que a fibrose também está presente no processo de cicatrização das lesões inflamatórias crônicas (BIOLO, et al., 2010). Dessa forma, investigamos a deposição de colágeno na cápsula formada ao redor da esponja de poliéster. Nossos resultados indicam aumento da fibrose em esponjas tratadas com rP21 (**Figura 7 C e E**).

O processo de fibrose no tecido cardíaco é caracterizado pelo acúmulo de miofibroblastos, deposição de colágeno, remodelamento da matriz extracelular e aumento da rigidez tecidual, reduzindo assim a elasticidade e conformação do tecido de modo que prejudica a função do órgão (CHEN, et al., 2012; ZERR, et al., 2016). As vias de sinalização Wnt/ β -catenina/TGF- β são mediadores chave para a ativação de fibroblastos e desempenham importante papel na condução de síntese anormal de matriz extracelular em doenças fibróticas

cardíacas. Além disso, foi visto que camundongos com hiperlipidemia aumentam o recrutamento de mastócitos ativados para o tecido cardíaco, induzindo aumento de fibrose cardíaca pela secreção de triptase e quimase, proteases intimamente relacionadas com ativação das vias de sinalização envolvendo Wnt/ β -catenina/ TGF- β (CHENG, et al., 2017).

Assim, nossa hipótese é que o maior número de mastócitos degranulados se correlaciona com o aumento da deposição de colágeno, pelo mecanismo supracitado, na presença da rP21. Este cenário reforça a nossa teoria de que a P21 secretada por amastigotas no tecido cardíaco, participa ativamente do desenvolvimento de problemas cardiovasculares durante a infecção crônica por *T. cruzi*.

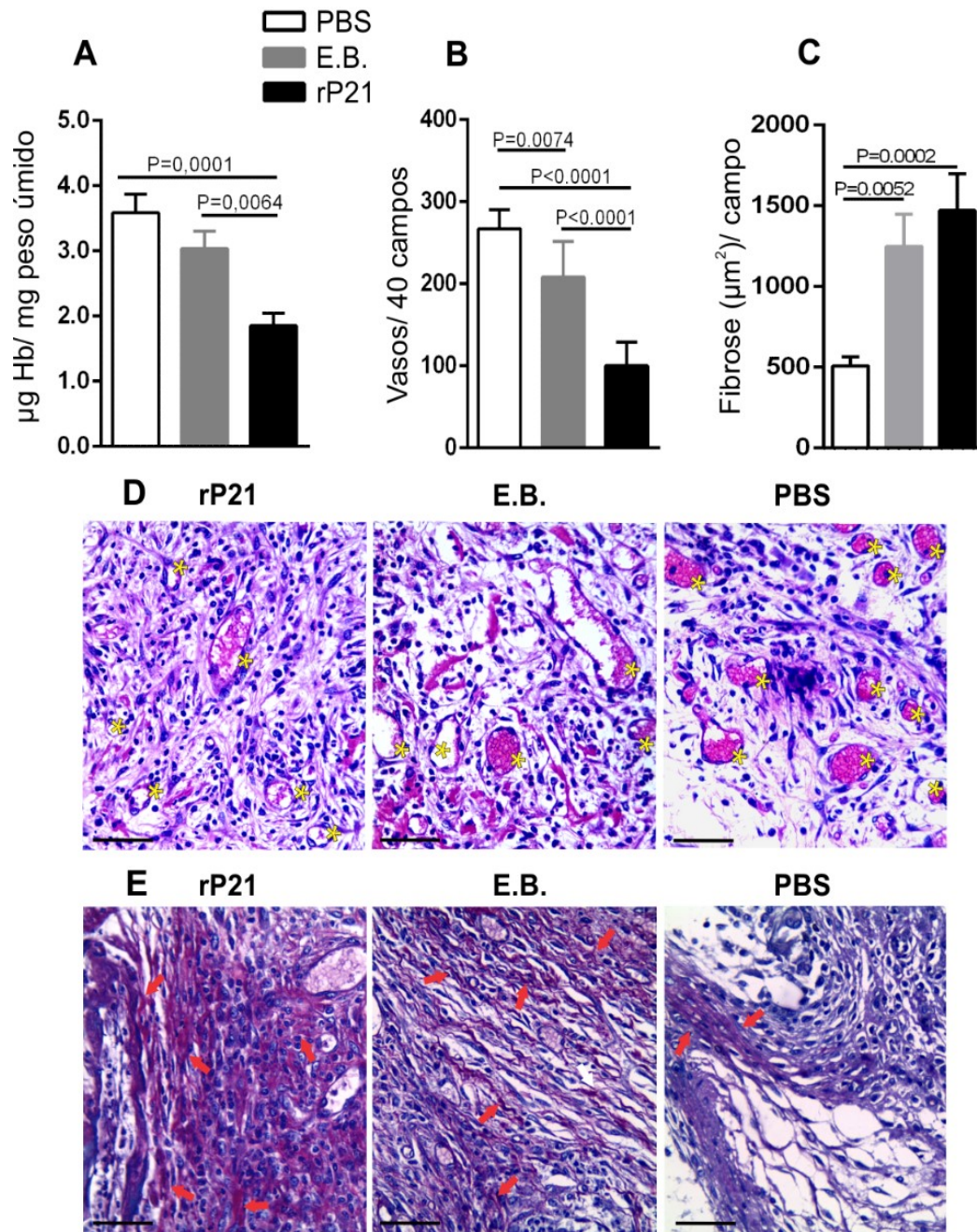


Figura 7. rP21 inibe angiogênese e aumenta a deposição de colágeno. **A.** Diminuição do conteúdo de hemoglobina em esponjas tratadas com rP21; **B.** Tratamento com a rP21 causou decréscimo do número de vasos comparado aos controles; **C.** rP21 aumentou a deposição de colágeno; **D.** Imagens representativas de cortes histológicos de esponjas coradas com HE; **E.** Imagens representativas de cortes histológicos de esponjas coradas com picrosirius red. Os asteriscos amarelos indicam a presença de vasos sanguíneos. As setas vermelhas indicam fibras colágenas. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

7.3 rP21 apresenta estabilidade biológica *in vitro* e *in vivo*

No experimento anterior, utilizando as esponjas de poliéster, nós realizamos o tratamento com a P21 *in situ*. Assim, com o intuito de verificar se a rP21 poderia ser utilizada em tratamentos por via subcutânea, nós avaliamos a atividade proteolítica das proteínas do soro de camundongos saudáveis sobre a rP21 após 24 horas de incubação. Embora a rP21 apresentou uma discreta degradação após a incubação com o soro, verificamos que a degradação ocorreu devido a clivagem da *tag* de histidina, comprovada pela incubação da rP21 com trombina. Apesar desta alteração no perfil proteico, a incubação com o soro murino não provocou prejuízo da atividade pró-fagocítica da rP21 (**Figura 8 A e B**).

Além disso, nós tratamos camundongos BALB/c com rP21 ou PBS e após 72 horas nós detectamos a presença da proteína no soro por ensaio de ELISA (**Figura 8 C**). Esses resultados demonstram a estabilidade da proteína rP21 *in vivo*, corroborando com um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, que demonstrou rápido renovelamento proteico após desnaturação pelo calor, sem prejuízo da atividade pró-fagocítica (DOS SANTOS, et al., 2014).

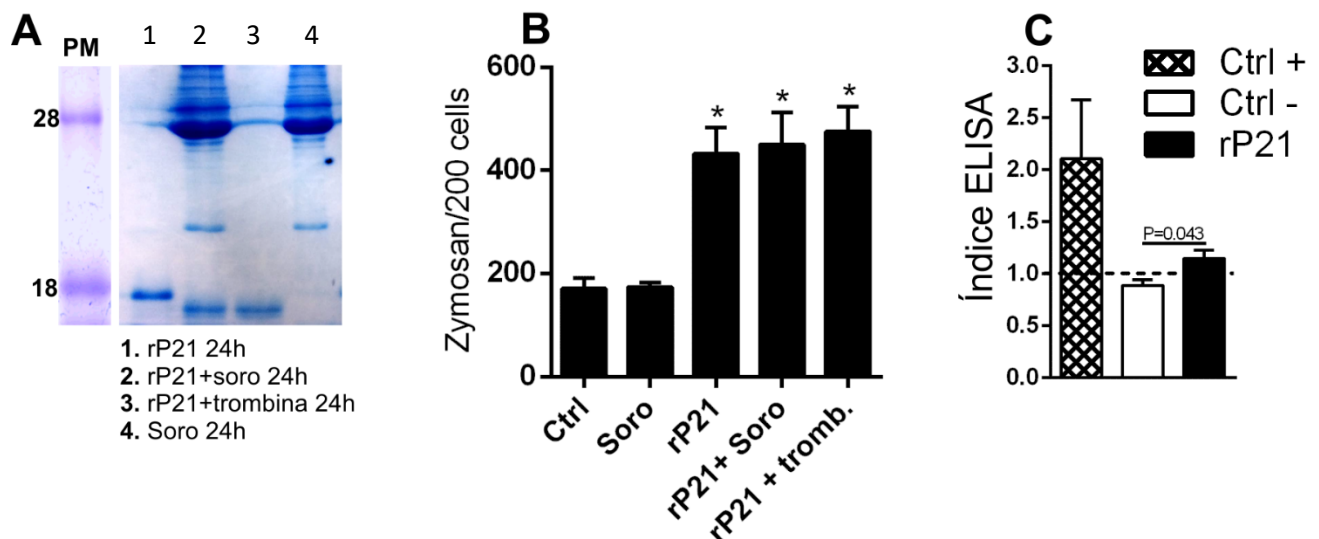


Figura 8. Componentes do soro murino não interferem na atividade biológica da rP21. **A.** Imagem representativa de gel de poliacrilamida contendo o perfil de bandas da rP21 incubada com soro murino e trombina por 24 horas; **B.** Soro murino não inibiu atividade pró-fagocítica da rP21; **C.** Detecção da rP21 após 72 horas de tratamento em camundongo BALB/c. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

7.4 rP21 atua de maneira espécie-específica

Após verificar a estabilidade da proteína, nós decidimos então, avaliar o papel espécie específico da P21 na infecção crônica por *T. cruzi*. Para isso, nós infectamos camundongos BALB/c com duas espécies distintas de protozoários intracelulares, pertencentes à mesma família Tripanosomatidae, *L. (L) amazonensis* e *T. cruzi*, e comparamos os efeitos biológicos causados pela rP21 durante e após 6 semanas (infecção crônica) em ambos os grupos infectados e nos grupos controles não infectados.

Protozoários intracelulares utilizam a maquinaria da célula para se replicar, se “esconder” da resposta imune, e perpetuar o sucesso da infecção. Dessa forma, teria a P21 importância na manutenção da infecção por *T. cruzi*?

Para responder isso, camundongos BALB/ c foram divididos em 6 grupos: infectados com *L. (L) amazonensis*, *T. cruzi* ou não infectados e tratados com PBS ou rP21. Os parasitos foram inoculados por via subcutânea nas patas traseiras, e ao longo de 6 semanas após a infecção, os camundongos foram tratados em intervalos de 72 horas pela mesma via. Uma vez por semana nós medimos a altura e largura das patas de ambos os grupos infectados comparando com os grupos não infectados. Ao final do período, os camundongos foram eutanasiados e as patas, os linfonodos do poplíteo, baço e coração foram removidos para diferentes análises.

Nós observamos que o tratamento com rP21 causou progressivo aumento das patas nos camundongos infectados com *L. (L) amazonensis*, entretanto, não houve alterações na área das patas dos grupos não infectados ou infectados com *T. cruzi* (**Figura 9 A-D**). Além disso, a análise histopatológica do tecido das patas e a medição da área do linfonodo demonstraram que nos camundongos infectados com *L. (L) amazonensis* e tratados com rP21 houve aumento do recrutamento de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e de edema no tecido das patas. E ainda, aumento exacerbado da área do linfonodo do poplíteo. Em contraste, no grupo infectado com *T. cruzi* e tratado com rP21 houve aumento do edema no tecido das patas, mas não houve alterações nos outros parâmetros analisados. A área do linfonodo popliteal do grupo infectado com *T. cruzi* apresentou discreto aumento na presença de rP21 (**Figura 9 E-G**) (**Tabela 2A**).

A análise histopatológica dos tecidos esplênicos dos camundongos infectados demonstrou que o tratamento com a proteína recombinante provocou aumento dos centros germinativos e edema. Porém, apenas no grupo infectado com *T. cruzi* e tratado com rP21 houve aumento da proliferação de linfócitos (**Tabela 2B**). Estes resultados corroboram com a atividade biológica da rP21, descoberta anteriormente, na indução da migração de macrófagos e neutrófilos *in vitro*, e, ainda, na quimiotaxia de leucócitos como, granulócitos, linfócitos e

monócitos 2-6 horas após inoculação intraperitoneal da proteína em camundongos não infectados (TEIXEIRA, et al., 2015).

A análise da carga parasitária das patas dos camundongos infectados demonstrou a presença de parasitos em todos os animais independente do patógeno utilizado na infecção. Nos camundongos infectados com *L. (L) amazonensis* e tratados com rP21 houve aumento da carga parasitária em 10 vezes. Entretanto, surpreendentemente, nos camundongos infectados com *T. cruzi*, a rP21 teve um efeito inverso, diminuindo a carga parasitária (**Figura 9 H-I**).

Dessa forma, até aqui, nossos demonstram que a rP21 causa efeitos distintos quando comparamos a infecção por ambos protozoários. Nossa hipótese é que a quimiotaxia de leucócitos promovido pela rP21 levou ao aumento da migração de células hospedeiras clássicas de *Leishmania*, os macrófagos, para o tecido das patas infectadas por *L. (L) amazonensis*. E assim, favoreceu sua replicação, já que estes macrófagos recrutados estavam sensibilizados principalmente pela proteína e não pelo parasito.

Por outro lado, citocinas de perfil Th2 induzem a conversão de L-arginina em ornitina, uma poliamina precursora de macrófagos arginase 1+ (perfil M2), que favorecem a replicação de protozoários intracelulares (DA SILVA, et al., 2002; MUXEL, et al., 2017). Além disso, é sabido também, que espécies do gênero *Leishmania* produzem sua própria arginase, o que contribui para o sucesso da infecção (DA SILVA, et al., 2012). Assim, acreditamos que o aumento da produção de IL-4 causado rP21 pode favorecer a sobrevivência e a proliferação de *L. (L) amazonensis*. Entretanto, a rP21 não tem o mesmo efeito sobre a infecção por *T. cruzi*, e parece inibir sua replicação.

A partir desses dados a principal pergunta que surgiu foi: Será que a diferença observada na atividade da rP21 sobre a infecção por *L. (L) amazonensis* e *T. cruzi* foi devido às características intrínsecas às infecções? Já que a leishmaniose cutânea é uma infecção local e infecção por *T. cruzi* é mais sistêmica. Assim, decidimos investigar o tecido cardíaco.

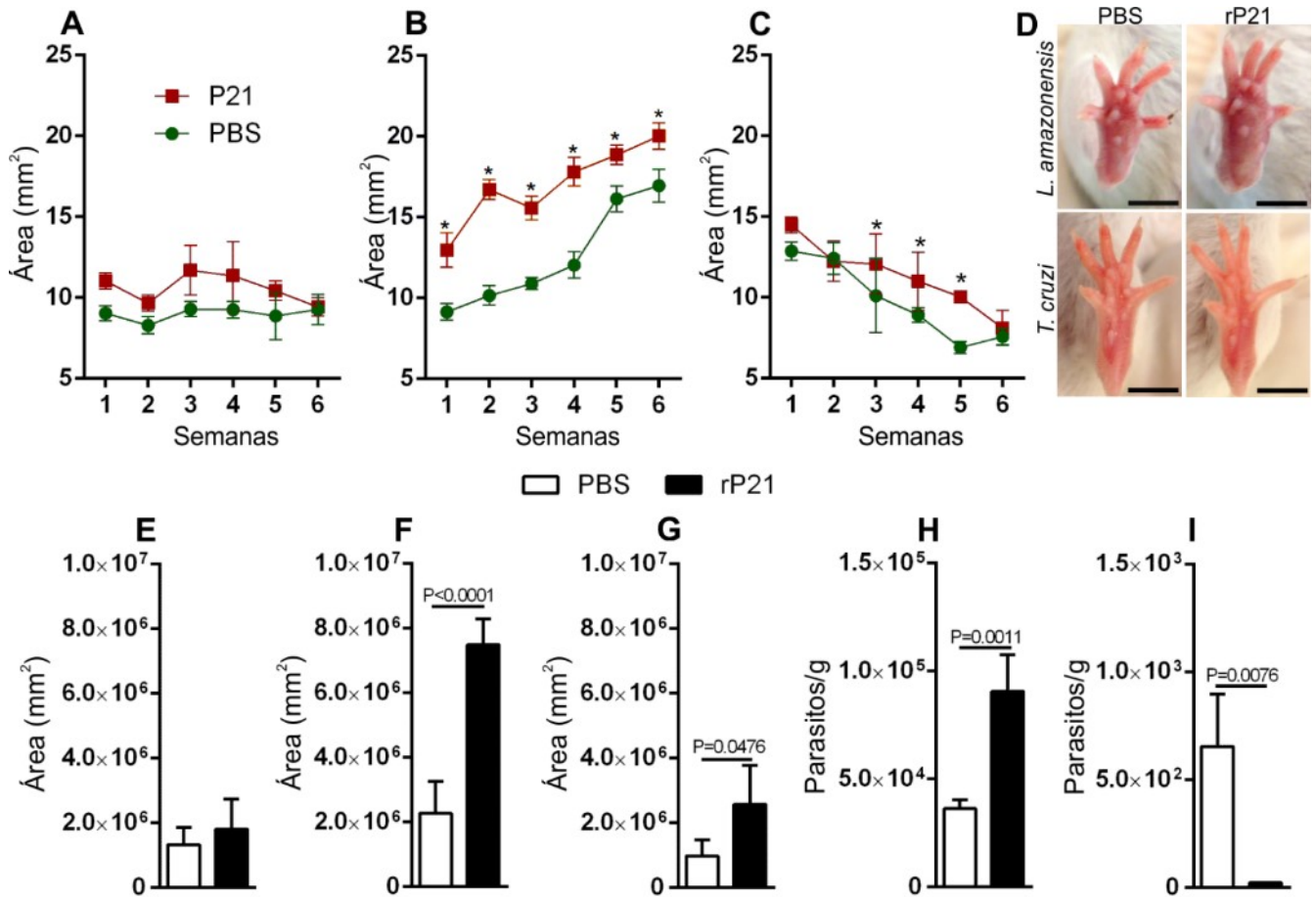


Figura 9. rP21 favorece infecção por *L. (L.) amazonensis*, mas não por *T. cruzi*. A-C. rP21 promoveu maior crescimento das patas em camundongos infectadas com *L. (L.) amazonensis* em relação ao controle tratado com PBS. Média da área das patas não infectadas, infectadas com *L. (L.) amazonensis* e infectadas com *T. cruzi*, respectivamente; D. Imagem representativa do tamanho das patas entre os grupos tratados ou não com rP21; E-G. Em camundongos BALB/c tratados com rP21 e infectados com *L. (L.) amazonensis* houve aumento da área dos linfonodos popliteais. Área dos linfonodos de animais não infectados, infectados com *L. (L.) amazonensis* e *T. cruzi*, respectivamente; H e I. Tratamento com a proteína recombinante aumentou a carga parasitária de patas infectadas com *L. (L.) amazonensis* e diminuiu em patas infectadas com *T. cruzi*, respectivamente. Os dados da carga parasitária foram determinados por PCR quantitativo em tempo real. Gráficos representam média \pm desvio padrão. Os ensaios foram realizados com n=5 animais/ grupo, em dois experimentos biológicos independentes. Barras de escalas representam 0,5 cm. As diferenças estatísticas entre PBS e rP21 foram determinadas pelo teste two-tailed Mann-Whitney. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. * $P < 0,05$.

7.5 rP21 e a CCC

Para avaliar a atividade da P21 no desenvolvimento da CCC, a determinação da carga parasitária e a análise histopatológica do tecido cardíaco foram realizadas. Nossos resultados mostram que no coração, assim como nas patas, houve redução drástica da carga parasitária (50%) nos camundongos que receberam o tratamento com a rP21 (**Figura 10 A**).

Por outro lado, a rP21 provocou aumento na deposição de colágeno (**Figura 10 B-D**), quando comparado ao controle tratado com PBS. Este dado corrobora com os dados obtidos quando tratamos implantes de esponjas de poliéster durante o processo de inflamação crônica, demonstrado anteriormente neste estudo. Um estudo minucioso sobre os mecanismos celulares que resultam em aumento da deposição de colágeno desencadeados pela P21 será realizado pelo nosso grupo de pesquisa.

A análise histopatológica do tecido cardíaco mostrou que nos animais não infectados e tratados com a proteína recombinante ocorreu maior recrutamento de macrófagos e linfócitos. Já nos tecidos infectados e tratados com rP21 houve aumento da resposta inflamatória, edema e recrutamento de macrófagos, linfócitos, fibroblastos (**Figura 10 E**), (**Tabela 2C**).

Em estudos previamente realizados pelo nosso grupo, foi visto que a rP21 possui atividade anti-angiogênica *in vitro*, no qual células tEND tratadas com a proteína inibiram sua proliferação e assim, não foram capazes de formar vasos fechados. E ainda, o tratamento com rP21 regulou, de forma dependente da ligação com o receptor CXCR4, a expressão de genes relacionados ao processo de vascularização (TEIXEIRA, et al., 2017). Neste estudo, nossos dados mostram que a rP21 reduziu também o número de vasos no tecido cardíaco infectado por *T. cruzi* (**Figura 10 F-H**).

O receptor CXCR4 e seu ligante a quimiocina CXCL12 estão expressos em miócitos e fibroblastos cardíacos. A injúria no tecido cardíaco é marcada pela presença de células progenitoras que expressam CXCR4 e pelo recrutamento de células inflamatórias que auxiliam na reconstrução do tecido lesado (WEN, et al., 2012; DÖRING, et al., 2014). Assim, as atividades anti-angiogênica e inflamatória observadas na presença de rP21 poderiam ser explicadas pela atividade quimiotática da proteína e pela competição entre P21 e quimiocinas ligantes de CXCR4. Este cenário atrapalharia o reparo tecidual, favorecendo o aparecimento de dano cardíaco, que juntamente com o aumento da fibrose caracterizam um quadro de isquemia, frequentemente observado na CCC.

Nossos ensaios demonstram que o efeito da rP21 sobre a fibrose e a angiogênese é mais intenso nos animais infectados do que nos não infectados. Isto acontece, provavelmente, devido a presença da P21 nativa secretada por amastigotas dentro das células, que juntamente com o

tratamento com a rP21 potencializaram a atividade biológica da proteína, exacerbando as alterações teciduais.

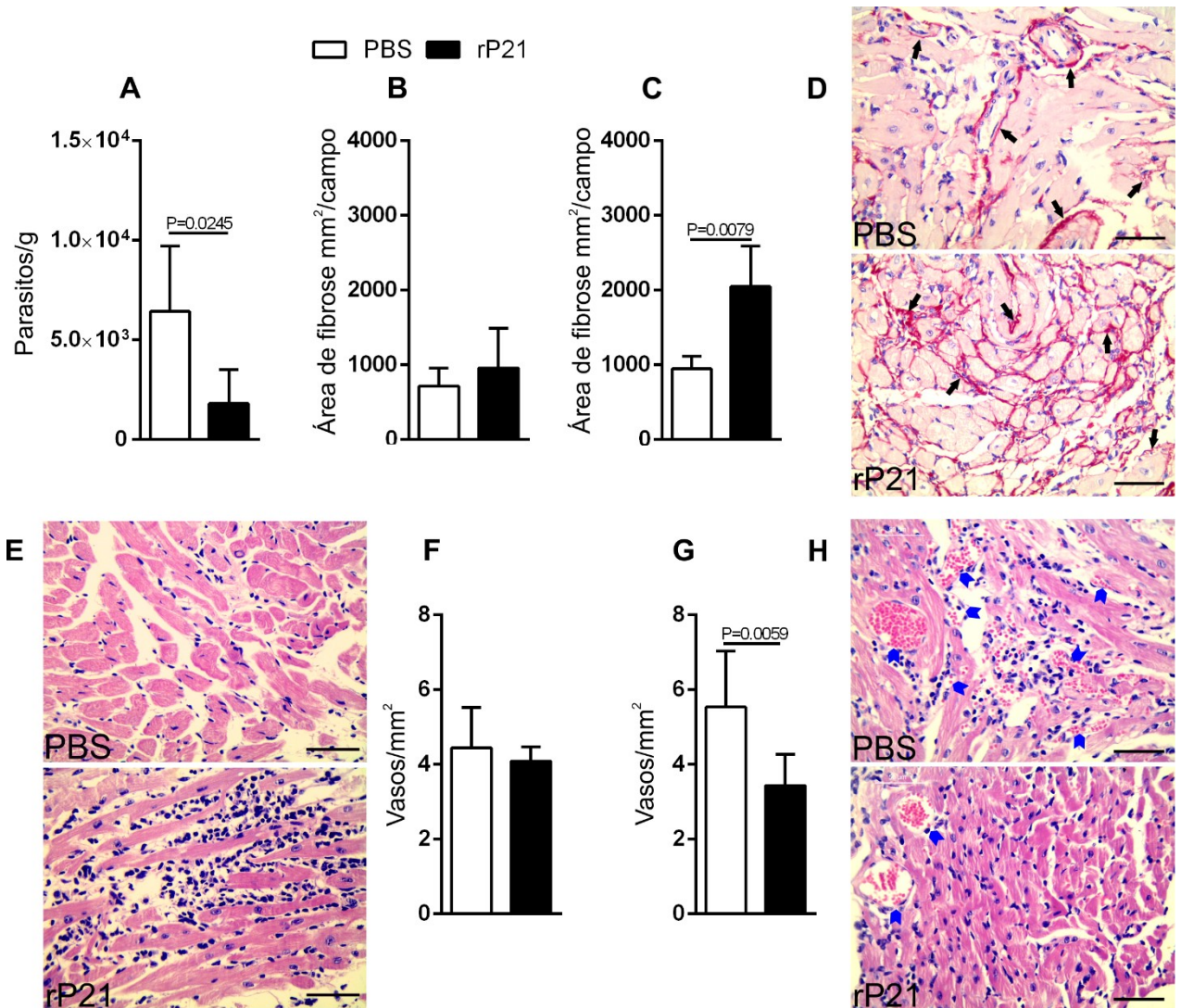


Figura 10. rP21 diminui carga parasitária no tecido cardíaco infectado com *T. cruzi*. A. rP21 reduz em 50% o número de parasitos no tecido cardíaco; B e C. rP21 aumenta a deposição de colágeno em comparação com PBS. Tecido não infectado e infectado, respectivamente; D. Imagem representativa da deposição de colágeno no tecido cardíaco nos dois grupos tratados; E. Imagem representativa do aumento dos focos inflamatórios no tecido cardíaco de camundongos tratados com rP21; F e G. rP21 tem efeito anti-angiogênico no tecido cardíaco. Gráficos representam a contagem do número de vasos em ambos tecidos, não infectado e infectado com *T. cruzi*, respectivamente; H. Imagem representativa dos vasos sanguíneos nos tecidos cardíacos. Barras de escala representam 50 μ m. Setas pretas indicam deposição de fibras colágenas e setas azuis indicam vasos sanguíneos. As diferenças estatísticas entre PBS e rP21 foram determinadas pelo teste two-tailed Mann-Whitney. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Tabela 2. Análise do infiltrado inflamatório nos diferentes tecidos e grupos tratados.

Órgão	Critérios histológicos	Não infectado		<i>T. cruzi</i>		<i>L. amazonensis</i>							
		PBS	rP21	PBS	rP21	PBS	rP21						
(A) Tecido das patas	Resposta inflamatória	-	-	C.D. (++)	C.D. (++)	C.D. (++)	C.D. (+++)						
	Neutrófilos	-	-	-	-	-	-						
	Macrófagos	+*	+*	++	++	++	+++						
	Linfócitos	+*	+++*	++	++	++	+++						
	Plasmócitos	-	-	+	+	+	++						
	Células gigantes	-	-	-	-	-	-						
	Necrose	-	-	-	-	-	-						
	Edema	-	-	+	++	+	++						
	Fibroblastos	+*	+*	+*	+*	+++*	+++*						
	Fibrose	-	-	+	+	-	-						
Adipócitos	+*	+*	+*	+*	+++*	+++*							
Órgão	Critérios histológicos	Não infectado				<i>T. cruzi</i>				<i>L. amazonensis</i>			
		PB		PV		PB		PV		PB		PV	
(B) Tecido esplênico	Resposta inflamatória	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
	Neutrófilos	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Macrófagos	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	Linfócitos	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++
	Plasmócitos	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	Células gigantes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Megacariócitos	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Centros Germinais	+	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-
	Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Edema	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+	+	++	++
Fibroblastos	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Adipócitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Órgão	Critérios histológicos	Não infectado				<i>T. cruzi</i>							
		PBS		rP21		PBS		rP21					
(C) Tecido cardíaco	Resposta inflamatória	-				++				+++			
	Neutrófilos	-				-				-			
	Macrófagos	+#				++				+++			
	Linfócitos	+#				++				+++			
	Plasmócitos	-				-				-			
	Células gigantes	-				-				-			
	Necrose	-				-				-			
	Edema	-				++				+++			
	Fibroblastos	+#				+				++			
	Adipócitos	-				-				-			

(-) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) intenso.

*Células residentes não inflamatórias; C.D.: Crônica Difusa

PB: Polpa branca; PV: Polpa vermelha

#Região perivascular

7.6 rP21 modula a replicação e o ciclo celular de *T. cruzi*

Baseando nos dados obtidos até aqui, outras duas perguntas surgiram: o efeito biológico da P21 nos tecidos infectados com *T. cruzi* poderia ser explicado pelo aumento da resposta imune do hospedeiro, gerando inflamação e diminuindo a proliferação do parasito? E ainda, poderia a P21 ter ação direta no parasito modulando sua replicação?

Assim, tratamos camundongos BALB/c com rP21, em intervalos de 72h, durante 6 semanas. Uma vez por semana colhemos o sangue dos camundongos e analisamos a produção de anticorpos ao longo do tempo.

Nossos resultados mostram que a partir da terceira semana anticorpos específicos contra P21 foram detectados. Entretanto, ao decorrer das semanas, não houve aumento na titulação dos anticorpos, uma vez que normalizamos os ensaios, de forma que se houvesse aumento, o índice ELISA deveria aumentar, semelhante ao controle +, que corresponde ao soro de camundongos imunizados com rP21 e adjuvante (**Figura 11 A**). Assim, o organismo foi capaz de gerar resposta à presença da proteína, mas não de forma robusta.

Estudos demonstram a importância dos anticorpos para sobrevivência do hospedeiro e eliminação de parasitos (CHOI; REISER, 1998). Brener 1986, propõe que anticorpos tripanolíticos produzidos durante uma infecção ativa são um dos principais mecanismos de controle da infecção por *T. cruzi* em murinos e humanos. Entretanto, durante a fase aguda da infecção, células B de camundongos mostram baixa reatividade a antígenos parasitários, *in vitro* (TARLETON; KUHN, 1985). Esta imunossupressão humoral observada pode ser devido ao fato de que a produção de células B policlonalmente ativadas, as quais produzem anticorpos não específicos e falham em se ligar a antígenos do parasito, supera o número de células B específicas (HAYES; KIERSZENBAUM, 1981).

Além disso, células B isoladas na fase aguda da infecção, possuem uma reatividade prejudicada aos ativadores policlonais, indicando um possível efeito imunossupressor (KIERSZENBAUM; MORETTI; SZTEIN, 1993). Já foi demonstrado que linfócitos B estimulados apresentam expressão reduzida de receptores da interleucina-2 (IL-2R) na presença de tripomastigotas de *T. cruzi* (HERNANDEZ-MUNAIN, et al., 1993). Além disso, Zuniga, et al., 2000 demonstrou que a ativação de células B durante a infecção experimental aguda não é uma resposta generalizada. Outro estudo ainda, sugere que a imunossupressão pode ser causada por antígenos de *T. cruzi* (BRYAN, et al., 2010). Juntas, essas descobertas fornecem evidências para a coexistência de imunossupressão de células B e ativação policlonal durante a infecção por *T. cruzi*.

A partir desses dados nós investigamos o efeito da rP21 na replicação (72 horas) e no ciclo celular de ambos os parasitos *L. (L.) amazonensis* e *T. cruzi in vitro*. Vimos que a rP21

não influenciou a replicação intracelular de *L. (L.) amazonensis* e não teve efeito algum sobre o ciclo celular deste parasito. Entretanto em *T. cruzi* a rP21 reduziu a replicação intracelular (**Figura 11 B-C**), o que foi confirmado pela análise do ciclo celular, no qual a proteína aumentou a fase G1 e reduziu a fase de síntese (S) (**Figura 11 D-F**).

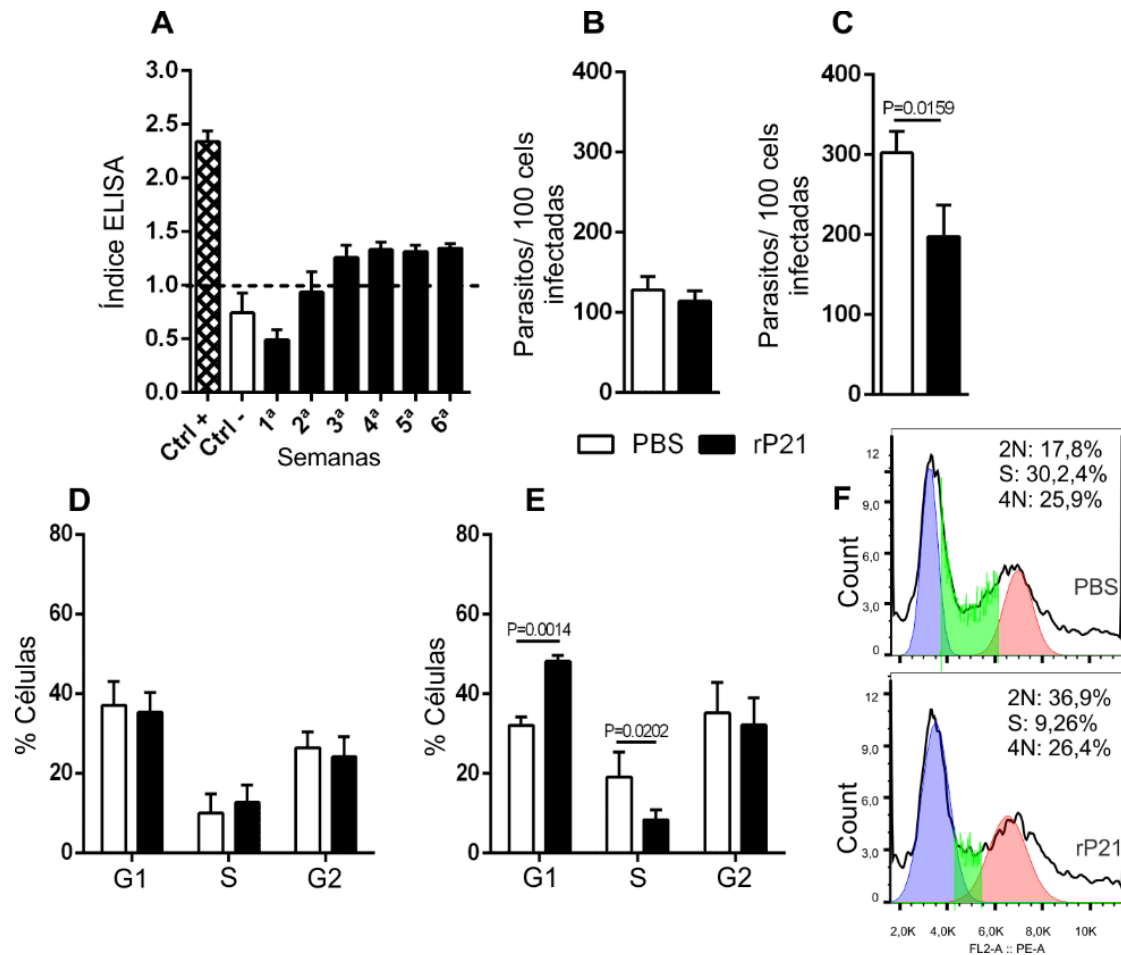


Figura 11. rP21 não induz elevada produção de anticorpos, mas demonstra atividade sobre a replicação e o ciclo celular de *T. cruzi*. A. Produção discreta de anticorpos inicia após a 3ª semana de tratamento com rP21; B e C. rP21 não tem atividade sobre a replicação de *L. amazonensis*, entretanto, diminui replicação de *T. cruzi* *in vitro*; D e E. rP21 não interfere no ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis*, mas aumenta G1 e diminui S em epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Y. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 9 replicatas técnicas obtidas a partir de 3 experimentos biológicos independentes. As diferenças estatísticas entre PBS e rP21 foram determinadas por two-tailed Mann-Whitney. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Em trabalhos anteriores, demonstramos que a rP21 tem atividade pró-fagocítica, induz a invasão de protozoários e foi capaz de controlar a replicação intracelular *in vitro* (RODRIGUES, et al., 2012b; MARTINS, 2015). Assim, juntos nossos trabalhos demonstram que a P21 desempenha um importante papel no início e ao longo da infecção por *T. cruzi*, modulando a injúria no tecido cardíaco e diminuindo a carga parasitária, ambas características da cardiomiopatia chagásica crônica (**Figura 12**).

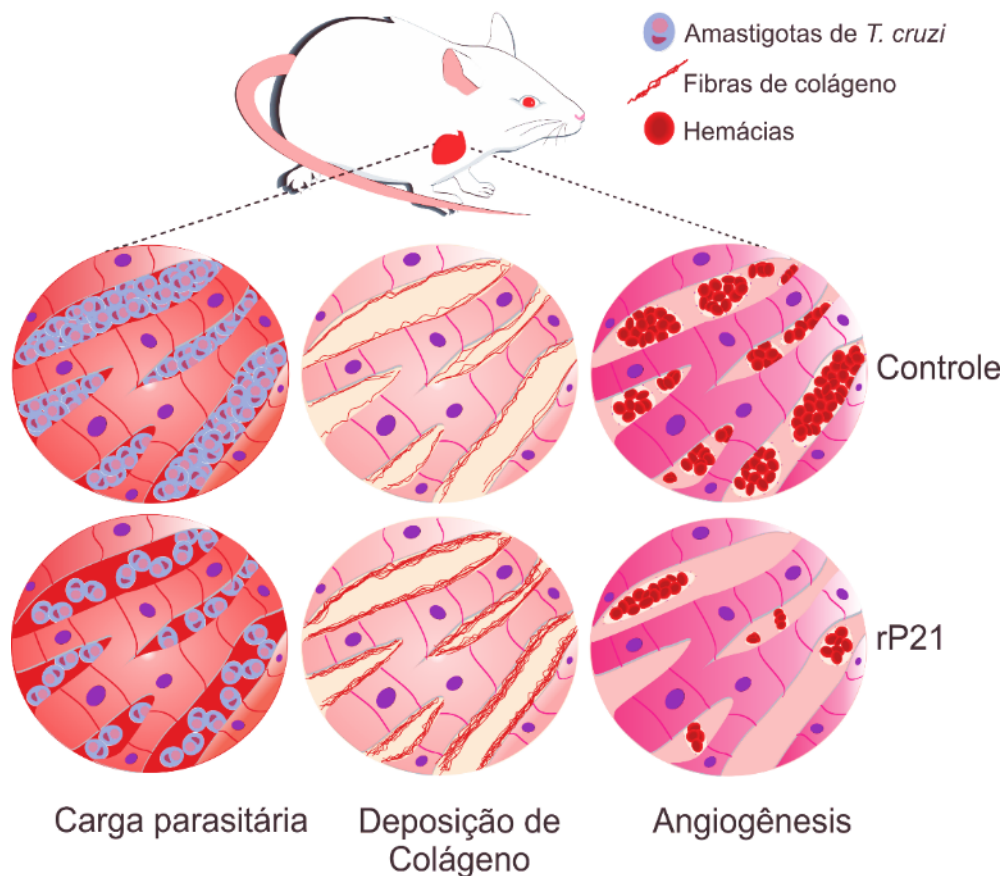


Figura 12. Proposta do papel da P21 no processo de cronificação da infecção por *T. cruzi*. Durante o processo de cronificação na infecção por *T. cruzi* há ausência de parasitemia, e uma porcentagem considerável dos indivíduos infectados desenvolvem problemas cardiovasculares, a cardiomiopatia chagásica crônica. Aqui nós propomos que a proteína P21 secretada pelas formas amastigotas presentes nos tecidos infectados, controla a replicação parasitária, aumenta a inflamação com consequente deposição de colágeno e ainda reduz o processo natural de formação de vasos sanguíneos. Assim, tem papel importante na continuidade da infecção e na sobrevivência do hospedeiro. Figura de TEIXEIRA, T.L.

Portanto, estamos diante de um mecanismo único utilizado pelo *T. cruzi* para garantir sua sobrevivência e à do hospedeiro. Descrito de forma inédita pelo nosso grupo de pesquisa, contribui para o melhor entendimento da patologia da doença de Chagas e de seu processo de cronificação.

7.7 Peptídeo ligante inibe atividades da P21

A partir das atividades biológicas demonstradas pela rP21 no contexto da infecção por *T. cruzi*, decidimos utilizar um peptídeo sintético, a partir da descoberta de uma sequência de aminoácidos com alta afinidade pela proteína recombinante. O intuito de utilizar um peptídeo ligante da rP21 se justificou pela possibilidade deste peptídeo inibir as atividades biológicas da proteína.

Assim, dois peptídeos foram utilizados nos experimentos a seguir. O P1 é um dos peptídeos que possuem alta afinidade pela rP21, já o P1S é um peptídeo irrelevante (controle) que apresenta o mesmo número de aminoácidos do P1, mas não possui afinidade pela proteína.

Primeiramente, fizemos ensaios de viabilidade celular e posteriormente, realizamos uma sequência de ensaios testando a capacidade inibitória do peptídeo sobre as atividades da rP21 já descritas. O P1 sozinho e em conjunto com a rP21 não provocou citotoxicidade em macrófagos (iMo), mas foi capaz de inibir a polimerização do citoesqueleto de actina induzido na presença de rP21 (**Figura 13 A-C**). Por outro lado, P1 não inibiu a atividade quimiotática da proteína, e sozinho também foi capaz de promover atividade quimiotática sobre os macrófagos (**Figura 13 D e E**). Para compreender melhor estes dados, nós pretendemos fazer uma predição dos sítios de ligação entre a rP21 e o P1.

Os dados obtidos até aqui utilizando o P1 nos encorajaram a prosseguir com a investigação, uma vez que a nós acreditamos que a indução da polimerização de actina causada pela rP21 pode estar relacionada com a contenção da replicação intracelular do parasito, característico da infecção crônica. E por outro lado, a não inibição da atividade quimiotática da rP21 pode ser um ponto favorável para a resposta inflamatória celular contra o parasito.

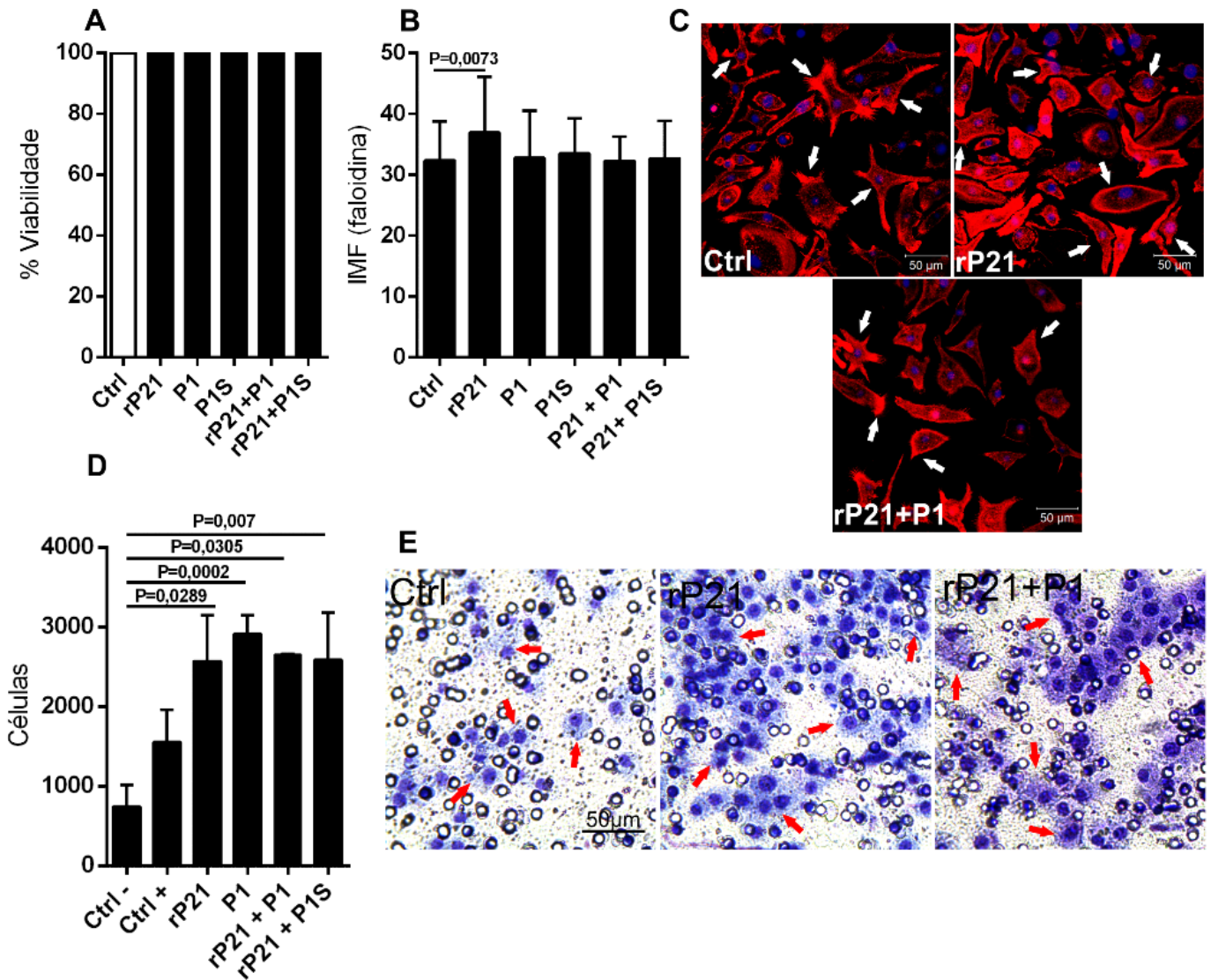


Figura 13. Peptídeo (P1) é capaz de inibir a polimerização de actina, mas não a quimiotaxia induzida na presença de rP21. A. Tratamentos não causam citotoxicidade em iMo; B e C. P1 inibe aumento da polimerização de actina causada pela rP21; D e E. P1 não inibe atividade quimiotática da rP21. Ctrl negativo representa células mantidas com meio DMEM não suplementadas com SFB; e o Ctrl positivo representa células que migraram em direção ao tratamento com meio DMEM + quimiocina SDF-1 α . As setas brancas indicam os filamentos de actina marcados com faloidina-TRITC. Já as setas vermelhas indicam macrófagos que migraram em direção ao agente quimiotático. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Assim realizamos um ensaio de angiogênese utilizando células endoteliais derivadas de hemangioma tímico murino (t-END) aplicadas sobre um matrigel (que contém moléculas da matriz extracelular) na presença de rP21 e/ou P1. Nossos resultados mostram que P1 não é tóxico para as células endoteliais e foi capaz de inibir completamente a atividade anti-angiogênica da proteína recombinante (**Figura 14 A-C**).

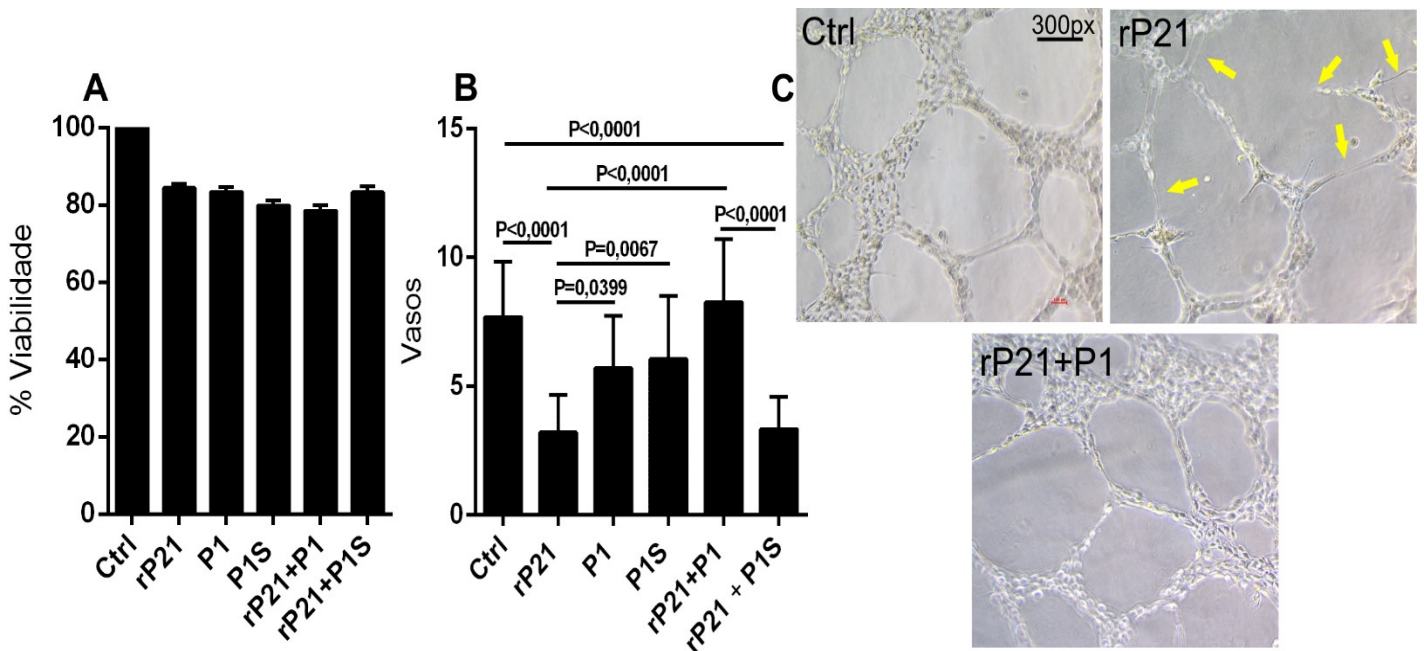


Figura 14. P1 é capaz de inibir a atividade anti-angiogênica induzida pela rP21. A. Tratamentos não causam citotoxicidade tEND; **B e C.** P1 não interfere na angiogênese e, na presença da rP21 inibe a atividade anti-angiogênica. As setas amarelas demonstram o efeito da P21 sobre as células endoteliais, as quais não conseguem formar vasos fechados. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Avaliamos ainda, o efeito do P1 sobre a invasão e a replicação de *T. cruzi* (cepa G). Vimos que o P1 sozinho tem atividade antiparasitária, sendo capaz de inibir a invasão do parasito, o que indica a inibição da P21 nativa, ou seja, aquela produzida pelo próprio parasito (**Figura 15 A-C**). Em estudos prévios (dados não publicados) vimos que as cepas de *T. cruzi*, expressam quantidades distintas de P21. A cepa Y, considerada uma cepa mais infectiva, expressa menor quantidade de P21 do que a cepa G, caracterizada por provocar uma infecção mais branda, com ausência de parasitemia. Sendo assim, a inibição do P1 sobre a invasão da cepa G está de acordo com a maior expressão da proteína. Por fim, na presença de P1 os parasitos replicaram mais após 72 h do que nos controles (**Figura 15 D**).

A partir dos resultados obtidos com P1 *in vitro*, pretendemos avaliar em nossos estudos, o efeito da utilização do peptídeo sobre a infecção por *T. cruzi* da cepa G *in vivo*. Nossa hipótese é que o tratamento com o P1 possa inibir a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e a modulação do ciclo celular do parasito, deixando o parasito mais exposto na corrente sanguínea. Este cenário, juntamente com a quimiotaxia promovida pelo P1 poderia favorecer a ação da resposta imunológica nos parasitos extracelulares e diminuir as possibilidades de cronificação da doença.

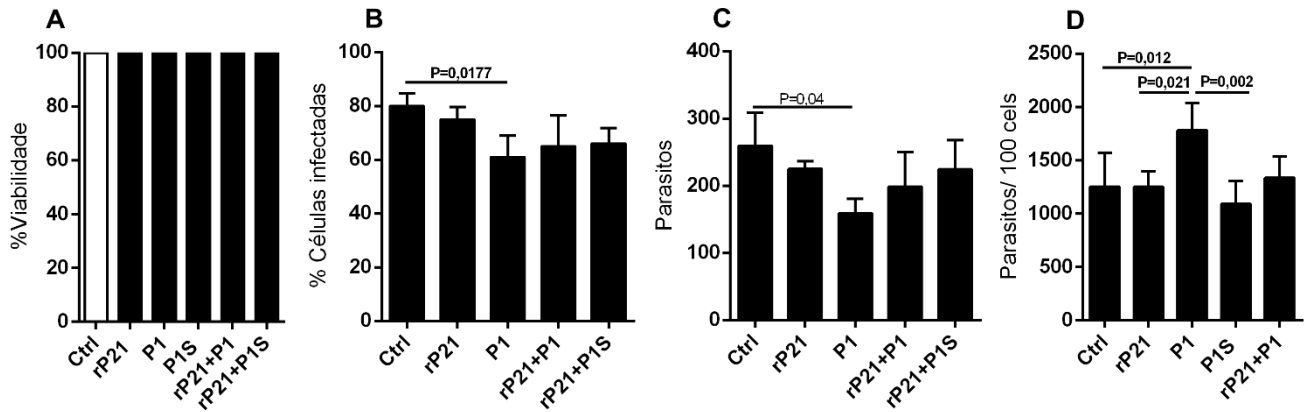


Figura 15. P1 inibe a invasão e aumenta a replicação de *T. cruzi* em iMo. **A.** Tratamentos não causam citotoxicidade em *T. cruzi* após 72h; **B e C.** P1 inibe a invasão e a carga parasitária de *T. cruzi* em iMo. **D.** P1 induz a replicação de *T. cruzi* em iMo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal-Wallis e Dunn's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

8. Conclusões

A partir dos dados obtidos nesse estudo podemos concluir que a rP21 promove a produção de IL-4, tem atividade quimiotática e inibe a angiogênese durante o processo de inflamação crônica. Além disso, possui estabilidade funcional na presença de soro murino. Apresenta atividade espécie específica na infecção por *T. cruzi* controlando a replicação parasitária, induzindo fibrose e inibindo a angiogênese no tecido cardíaco, indicando importante papel da rP21 no processo de cronificação. E ainda, não foi capaz de promover produção robusta de anticorpos ao longo de seis semanas de tratamento.

Por fim, o peptídeo ligante da P21 (P1) não foi capaz de inibir a quimiotaxia de macrófagos. Entretanto, inibiu as atividades de polimerização do citoesqueleto de actina, anti-angiogênica, invasão e de controle da replicação intracelular.

Neste estudo descrevemos a importância da proteína P21 ao longo da infecção por *T. cruzi*. Demonstramos também, uma ferramenta com potencial de inibição das atividades da proteína, que poderá resultar em uma alternativa de controle na progressão da Doença de Chagas.

9. Referências bibliográficas

ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V., et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** v. 172, p. 493-502, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.493>

ALMEIDA, H. O.; PEREIRA, F. E.; TAFURI, W. L. Mast cells in Chagas' chronic cardiopathy. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 17, p. 5-9, 1975.

ALVAR, J., et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. e35671, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

ALVAREZ, M. G., et al. HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p. e288, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000288>

ALVAREZ, M. N., et al. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **J Biol Chem.**, v. 286, p. 6627-6640, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167247>

ANDRADE, S. P.; FAN, T. P. D.; LEWIS, G. P. Quantitative *in vivo* studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Br. J. Exp. Pathol.** v. 68, p. 755-766, 1987.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J Exp Med.**, v. 200, p. 1135-1143, 2004. <https://doi.org/10.1084/jem.20041408>

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol.**, v. 3, p. 819-823, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>

ANDRADE, J. P., et al. Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. **Arq Bras Cardiol**, v. 96, p. 434-442, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>

ANDREWS, N.W.; WHITLOW, M.B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 33, p. 249-256, 1989. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90086-8)

ANGELOVICH, T.A.; HEARPS, A.C.; JAWOROWSKI, A. Inflammation-induced foam cell formation in chronic inflammatory disease. **Immunol. Cell Biol.**, v. 93, p. 683-693, 2015. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.26>

ANTOINE, J.C., et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiol.**, v. 7, p. 392-401, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01324-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01324-9)

ARAYA, J. E., et al. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 65, p. 161-169, 1994. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90124-4](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90124-4)

ASSIS, R. R., et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1354-1365, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.001>

AZZAZY, H. M., HIGSMITH, W. E. Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)

BARATA, R. A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed research international**, 405083, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/405083>

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J., et al. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease form from an old infection? **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, p. e0003849.5, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003849>

BARRETO, M. P. Epidemiologia. In: BRENER Z, ANDRADE Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979. p. 89-151.

BARROS, M. L., et al. Association between left ventricular wall motion abnormalities and ventricular arrhythmia in the indeterminate form of Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 213-216, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000020>

BAILEY PJ. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**, v. 162, p. 327-334, 1988. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)62087-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)62087-8)

BELLOTTI, G., et al. *In vivo* detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. **Am.Heart J.** v. 131, p. 301-307, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(96\)90358-0](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(96)90358-0)

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 1-33, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00054-9)

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas cardiomyopathy clinical presentation and management in the Americas. **Cardiol Clin.** v. 35, p. 31-47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.08.013>

BERMEJO, D. A., et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **Immunology**, v. 132, p. 123-133, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x>

BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. Chagas Cardiomyopathy—Where Do We Stand After a Hundred Years? **Prog. Cardiovasc. Dis.** v. 52, p. 300-316, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2009.11.008>

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p 347- 382, 1973. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>

BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease? **Parasitol. Today.**, v. 2, p. 196-202, 1986. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(86\)90193-6](https://doi.org/10.1016/0169-4758(86)90193-6)

BRIGIDO, R. T. S., et al. *Trypanosoma cruzi* modulates gene expression of plasma membrane repair-related proteins. **Acta Trop.** v. 16, p. 30369-2, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.008>

BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 26, p. 41, 2002.

BROWER, G. L.; JANICKI, J. S. Pharmacologic inhibition of mast cell degranulation prevents left ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats. **J. Card. Fail.**, v. 11, p. 548-556, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2005.05.005>

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.**, v. 4, p. e733, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000733>

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol.**, v. 49, p. 175-200, 1995. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001135>

CAMPOS, M. A., et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J Immunol**, v. 172, p. 1711-1718, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1711>

CARDOSO, S. M.; CUNHA, J. L. R.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>

CARRASCO-GUERRA, H. A., et al. Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. **Am. Heart J.** v. 113, p. 716-724, 1987. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(87\)90712-5](https://doi.org/10.1016/0002-8703(87)90712-5)

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol.** v. 25, p. 471-479, 2006. <https://doi.org/10.1191/0960327106het653oa>

CESTARI, I., et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Mol Immunol.**, v. 53, p. 328-334, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.015>

CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 181-192, 2015. <https://doi.org/10.2147/JIR.S90380>

CHEN, D., et al. Dermal β -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. **Development**, v. 139, p. 1522-1533, 2012. <https://doi.org/10.1242/dev.076463>

CHOI, P.; REISER, H. IL-4: role in disease and regulation of production. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, p. 317-319, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00690.x>

CORTEZ, C., et al. Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. **PLoS ONE**, v. 7, p. e42153, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042153>

COSTA, L. E., et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, p. 96-106, 2013. <https://doi.org/10.1128/CVI.00583-13>

COURA, J. R., et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol.**, v. 18, p.171-176, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02200-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02200-0)

CRUVINEL, W. M., et al. Immune system - Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Bras. J. Rheumatol**, v. 50, p. 434-461, 2010.

CUCUNUBÁ, Z. M., et al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1315-x>

DA SILVA, E. R., et al. Genomic organization and transcription characterization of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 727-737, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00002-4)

DA SILVA, M. F., et al. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS One.**, v. 7, p. e34022, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034022>

DE ARAUJO, T. H., et al. Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages. **Cell. Immunol.** v. 281, p. 27-30, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.002>

DESJARDINS, M; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan, **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 2061-2068, 1997. <https://doi.org/10.1084/jem.185.12.2061>

DERMINE, J. F., et al. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages, **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 1263-1270, 2005 <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00550.x>

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cell Biol.**, v. 86, p. 197- 283, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60180-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60180-1)

DE SOUZA, V. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DIAS, J. C. P. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. In: WENDEL S, BRENER Z, CAMARGO ME, RASSI A. Eds. ISBT, Sao Paulo, 1992. 49-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1993000200012>

DÖRING, Y., et al. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. **Front. Physiol.**, v. 5, p. 212, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00212>

DOS SANTOS, M. A., et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Sci. Rep.**, v. 4, p. 4259, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep04259>

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, p. 734-747, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>

FERNANDES, P. C. C. Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 45f. 2013.

FERREIRA, D., et al. Actin cytoskeleton-dependent and - independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infect. Immun.** v. 74, p. 5522-5528, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.00518-06>

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Med Clin (Barc.)**, v. 148, p. 125-131, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>

FRANCIS, G. S.; TANG, W. H. Histamine, mast cells, and heart failure: is there a connection? **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 48, p. 1385-1386, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.014>

FRANCO, M. F. Experimental carditis induced by *Trypanosoma cruzi* (y strain) in guinea pigs: correlation between histopathology and the presence of *T cruzi* antigens identified by indirect immunofluorescence. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 23, p. 187- 189, 1990. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821990000300013>

FRANCO- PAREDES, C.; BOTTAZI, M. E.; HOTEZ, P. J. The unfinished public health agenda of Chagas disease in the era of globalization. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 3, p. e470, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000470>

GARCIA, S., et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chaga's disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 1521-1528, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1521-1528.2005>

GARNOCK-JONES, K. P. Ecallantide: in acute hereditary angioedema. **Drugs**, v. 70, p. 1423-1431, 2010. <https://doi.org/10.2165/11205850-000000000-00000>

GAUR, U., et al. *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. **Exp. Parasitol.**, v. 122, p. 182-191, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.014>

GEDDES, K.; MAGALHÃES, J. G.; GIRARDIN, S. E. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. **Nat Rev Drug Discov.** v. 8, p. 465-479, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrd2783>

GENSEL, C.; ZHANG, B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. **Brain research**, v. 1619, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>

GHENG, Y. et al. Grande acúmulo de colágeno e aumento da ativação de mastócitos nos corações de ratos com hiperlipidemia. **Socied. Bras. Cardiol.**, v. 109, p. 404-409, 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20170143>

GUIZETTI, J.; SCHERF, A. Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Cell Microbiol**, v. 15, p. 718-726, 2013. <https://doi.org/10.1111/cmi.12115>

GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 190354, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/190354>

GUTIERREZ, F. R., et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 236-245, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900030>

HALL, B.F., et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J. Exp. Med.** v. 176, p. 313-325, 1992. <https://doi.org/10.1084/jem.176.2.313>

HARMS, G.; FELDMEIERA, H. The impact of HIV infection on tropical diseases. **Infect Dis Clin North Am**, v.19, p. 121-135, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.10.002>

HART, D. A. Curbing inflammation in multiple sclerosis and endometriosis: Should mast cells be targeted? **Int. J. Inflamm.**, v. 2015, p. 10, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/452095>

HAYES, M. M.; KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' disease: kinetics of lymphocyte responses and immunological control of transition from acute to chronic *T. cruzi* infection. **Infect. Immun.**, v. 31, p. 1117-1124, 1981.

HEALY, M. D. C., et al. Arrhythmias in Chagasic Cardiomyopathy. **Card Electrophysiol Clin**, v. 7, p. 251-268, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2015.03.016>

HELL, R. C. R., et al. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. **Clinical Immunology**, v.131, p.129-38, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2015.03.016>

HERNANDEZ-MUNAIN, C., et al. GP 50/55, a membrane antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in autoimmunity and immunosuppression. **Biol. Res.** v. 26, p. 209-218, 1993.

HIGUCHI, M. L., et al. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc Pathol**, v. 2, p. 101-106, 1993. [https://doi.org/10.1016/1054-8807\(93\)90021-S](https://doi.org/10.1016/1054-8807(93)90021-S)

HU, D. E., et al. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. **Lab. Invest.**, v. 72, p. 601-610, 1995.

INSTITUTO BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ (2016). Casos de doença de chagas têm aumento de 216% em 2016 no Acre. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/1282-casos-de-doenca-de-chagas-tem-aumento-de-216-em-2016-no-acre>>. Acessado em: 14 de março de 2018.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas' disease treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 102, p. 95-97, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000106>

JONES, E. M., et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 348-357, 1993. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.348>

JUNQUEIRA, C., et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, 2010. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001560>

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nat. Immunol.**, v. 9, 1215-1223, 2008. <https://doi.org/10.1038/ni.f.216>

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

KIERSZENBAUM, F.; MORETTI, E.; SZTEIN, M. B. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression. Altered expression by activated human lymphocytes of molecules which regulate antigen recognition and progression through the cell cycle. **Biol. Res.**, v. 26, p. 197-207, 1993.

KLINGBERG, F.; HINZ, B.; WHITE, E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. **J. Pathol.**, v. 229, p. 298-309, 2013. <https://doi.org/10.1002/path.4104>

LEWIS, M. D., et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **Int. J. Parasitol.** v. 39, p. 1305-1317, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.001>

LIMA, L., et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Tropica**, v. 151, p. 166-177, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>

LUCAS, T. et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **T. J. Immunol.**, v. 184, p. 3964-3977, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>

MACHADO, F. C. Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e caracterização biológica da proteína P21-His₆. Dissertação (Mestrado).

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 67f. 2014.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361>

MARCILI, A., et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641-655, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>

MARIN-NETO, J. A., et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation.**, v. 115, p. 1109-1123, 2007. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>

MARTIN, D. L., et al. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**, v. 2, p. e77, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020077>

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.

MARTINS, R. M., et al. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cell. Microbiol.** 13, 943–954, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01590.x>

MCCULLOCH, R.; HORN, D. What has DNA sequencing revealed about the VSG expression sites of African trypanosomes? **Trends Parasitol**, v. 25, p. 359–363, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.007>

MEUSER-BATISTA, M., et al. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Cell**. v. 40, p. 309-316, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2008.02.006>

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, p. 257-62, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300007>

MISHRA, B. B., et al. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, p. 107-123, 2009. <https://doi.org/10.2174/138955709787001758>

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00121>

MORTARA, R. A., et al. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **Infect. Immun.** v. 60, p. 4673-4678, 1992.

MUXEL, S. M., et al. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Sci Rep.**, v. 7, p. 44141, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44141>

NUNES, M. C., et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, p. 767-776, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

OSORIO L., et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes Infect**, v. 14, p. 1390-1402, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.003>

OLIVEIRA, A. C., et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J Immunol**, v. 173 p. 5688–5696, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5688>

OLSSON, N.; TAUB, D. D.; NILSSON, G. Regulation of mast cell migration by T and T cytokines: identification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-4 as mast cell chemotaxins. **Scand. J. Immunol.**, v. 59, p. 267-272, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01397.x>

PADILLA, A. M; SIMPSON, L. J.; TARLETON, R. L. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 183, p. 1245-1252, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901178>

PALOMINO, S. A.; AIELLO, V. D.; HIGUCHI, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 94, p. 571-579, 2000. <https://doi.org/10.1080/00034983.2000.11813580>

PARMLEY, S.; SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, p. 305–318, 1988. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90495-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90495-7)

PEREIRA-BARRETO, A. C., et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **Am. Heart J.**, v. 111, p. 307-312, 1986. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(86\)90144-4](https://doi.org/10.1016/0002-8703(86)90144-4)

PEREIRA NUNES, M. C., et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, p. 767-776, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

PIACENZA, L., et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J.**, v. 410, p. 359-368, 2008. <https://doi.org/10.1042/BJ20071138>

PIACENZA, L., et al. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **Int J Parasitol.**, v. 39, p. 1455-1464, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.010>

PIACENZA, L., et al. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxid Redox Signal.**, v. 19, p. 723-734, 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4618>

PITCOVSKY, T. A., et al. A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **J Infect Dis**, v. 186, p. 397-404, 2002. <https://doi.org/10.1086/341463>

PLUNKETT, M. L.; HAILEY, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Laboratory Investigation**, v. 62, p. 510-517, 1990.

POSTAN, M., et al. *In vitro* culture of cardiac mast cells from mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 105, p. 251-257, 1994. <https://doi.org/10.1159/000236765>

PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLoS One**, v. 8, p. e67976, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067976>

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **J Biol Chem.**, v. 288, p. 26464-26472, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472936>

RASSI, A.; RASSI Jr, A. Doença de Chagas. In: AMATO NETO, V.; GRYSCHKEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2008. p. 127-138.

REGUEIRO, A., et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. **Int J Cardiol**, v. 165, p. 107-112, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.07.089>

RIBEIRO, A. L., et al. T-wave amplitude variability and the risk of death in Chagas disease. **J Cardiovasc Electrophysiol**, v. 22, p. 799-805, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2010.02000.x>

RIBEIRO, V. S., et al. Development of specific scFv antibodies to detect neurocysticercosis antigens and potential applications in immunodiagnosis. **Immunology Letters**, v. 156, p. 59-67, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.005>

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasitol.** v. 71, p. 267-275, 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)

RODRIGUES, M. M., et al. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 220-223, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000300001>

RODRIGUES, A. A., et al. IFN- γ Plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Negl. Trop.Dis.**, v. 6, p. e1598., 2012. (a). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001598>

RODRIGUES, A. A., et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One**. V. 7, p. e51384, 2012. (b). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

RODRIGUEZ, N. E., et al. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. **PLoS ONE**, v. 6, p. e19000, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019000>

ROSENBERG, C. S.; MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. **J Immunol** v. 185, p. 560-268, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000432>

ROSSI, M. A.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **Am. J. Pathol.**, v. 114, p. 209-216, 1994.

ROSSI, M. A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **Am. Heart J.**, v. 120, p. 233-236, 1990. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(90\)90191-Y](https://doi.org/10.1016/0002-8703(90)90191-Y)

SABINO, E. C., et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. **Eur J Heart Fail**, v. 17, p. 416-423, 2015. <https://doi.org/10.1002/ejhf.220>

SAMBIASE, N. V., et al. Narrowed lumen of the right coronary artery in chronic chagasic patients is associated with ischemic lesions of segmental thinnings of ventricles. **Invest Clin**, v. 51, p. 531-539, 2010.

SACKS, D. L.; PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417-1419, 1984. <https://doi.org/10.1126/science.6701528>

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.011>

SECRETARIA DE ESTADO DE SAUDE DO AMAZONAS (SUSAM). FMT-HVD e FVS confirmam presença de parasita transmissor da Doença de Chagas em açaí. (2018). Disponível em: <http://www.saude.am.gov.br/visualizar-noticia.php?id=3054> Acessado em: 14 de março de 2018.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agente of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 577-579, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500017>

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, p. 845–852, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>

SHIMAMOTO, G., et al. Peptibodies: a flexible alternative format to antibodies. **MAbs**, v. 4, p. 586-591, 2012. <https://doi.org/10.4161/mabs.21024>

SHUKRA, A. M., et al. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. **Eur J Microbiol Immunol**, v. 4, p. 91-98, 2014. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.2.1>

SILVA-ALMEIDA, M., et al. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 315-318, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.006>

SILVA, C. V., et al. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>

SILVA, G. K., et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 184, p. 1148-1152, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902254>

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chem Rev**, v. 97, p. 391-410, 1997. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>

SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J Cell Biol**. 295394, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00339>

SPINAS, E., et al. Role of mast cells in atherosclerosis: A classical inflammatory disease. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol**, v. 27, p. 517-521, 2014. <https://doi.org/10.1177/039463201402700407>

STAHL, P., et al. Trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce apoptosis and STAT3 activation in cardiomyocytes in vitro. **Apoptosis**, v. 18, p. 653-663, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0822-x>

STUART, K., et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>

SUARÉZ, D.C., et al. Survival of *Trypanosoma cruzi* in experimentally contaminated drinks. **Bioméd Rev Inst Nac Salud.**, v. 32, p. 134-138, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000100015>.

SUGIYAMA, S., et al. Macrophage Myeloperoxidase Regulation by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Atherosclerosis and Implications in Acute Coronary Syndromes. **Am. J. Pathol.**, v.158, p. 879-891, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64036-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64036-9)

SUGIYAMA, S., et al. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 24, p. 1309-1314, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000131784.50633.4f>

SUN, N., et al. Mirror image phage display – Generating stable therapeutically and diagnostically active peptides with biotechnological means. **Journal of Biotechnology**, v. 161, p. 121-125, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.019>

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

TANOWITZ, H. B., et al. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 43, p. 274-281, 1990. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.274>

TARLETON, R. L.; KUHN, R. E. Measurement of parasite-specific immune responses *in vitro*: evidence for suppression of the antibody response to *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, v. 15, p. 845-850, 1985. <https://doi.org/10.1002/eji.1830150820>

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.** v. 31, p. 550-554, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00158-8)

TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, p. 233-238, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0481-9>

TEIXEIRA, T. L., et al. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 16877, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16877>

TEIXEIRA, S. C., et al. Mechanistic insights into the antiangiogenic activity of *Trypanosoma cruzi* protein 21 and its potential impact on the onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Sci. Rep.**, v. 21, p. 44978, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44978>

TSOUPRAS, A.; LORDAN, R.; ZABETAKIS, I. Inflammation, not cholesterol, is a cause of chronic disease, **Nutrients**, v. 10, p. 1-38, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10050604>

TZELEPIS, F., et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. **J Immunol**, v. **180**, p. 1737–1748, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1737>

UNENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.**, v. **28**, p. 335-344, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>

VERGOTE, V.; BURNEVICH, C.; VAN DE WIELE, DE SPIEGELEER, B. Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach. **J. Pept. Sci.**, v. **15**, p. 697-710, 2009. <https://doi.org/10.1002/psc.1167>

WEN, J., et al. SDF-1 α and CXCR4 as therapeutic targets in cardiovascular disease. **Am. J. Cardiovasc. Dis.**, v. **2**, p. 20-28, 2012.

WOOLSEY, A. M., et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J Cell Sci.**, v. **116**, p. 3611-3622, 2003. <https://doi.org/10.1242/jcs.00666>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340 (2017). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 11 de julho de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Epidemiological situation. (2015). Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acessado em: 05 de maio de 2018.

WU, W.K., et al. IL-4 Regulates Specific Arg-1(+) Macrophage sFlt-1-Mediated Inhibition of Angiogenesis. **Am. J. Pathol.** v. **185**, p. 2324-2335, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.013>

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v. **78**, p. 87-111, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000100010>

ZERR, P., et al. Sirt1 regulates canonical TGF-[beta] signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis. **Ann Rheum Dis.** v. 75, p. 226-33, 2016. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205740>

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 480-486, 1999. <https://doi.org/10.1086/314889>

ZINGALES, B., et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>

ZINGALES, B., et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, p. 240-253, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meeqid.2011.12.009>

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, p. 1-67, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

ZUÑIGA, E., et al. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. **Clin. Exp. Immunol.** v. 119, p. 507-515, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01150.x>

10. Produção científica durante o doutorado

1. FURTADO, FABIANA; BORGES, BRUNA; **TEIXEIRA, THAISE**; GARCES, HANS; ALMEIDA JUNIOR, LUIZ; ALVES, FERNANDA; SILVA, CLAUDIO; FERNANDES JUNIOR, ARY. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oil from *Blepharocalyx salicifolius*. International journal of molecular science, v. 19, p. 33, 2018.
2. PEREIRA, MARIANA NUNES; JUSTINO, ALLISSON BENATTI; MARTINS, MÁRIO MACHADO; PEIXOTO, LEONARDO GOMES; VILELA, DANIELLE DINIZ; SANTOS, PAULA SOUZA; **TEIXEIRA, THAISE LARA**; DA SILVA, CLÁUDIO VIEIRA; GOULART, LUIZ RICARDO; PIVATTO, MARCOS; ESPINDOLA, FOUED SALMEN. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. Industrial Crops and Products (Print), v. 97, p. 324-329, 2017.
3. TEIXEIRA, SAMUEL COTA; LOPES, DAIANA SILVA; GIMENES, SARAH NATALIE CIRILO; **TEIXEIRA, THAISE LARA**; DA SILVA, MARCELO SANTOS; BRÍGIDO, REBECCA TAVARES E SILVA; DA LUZ, FELIPE ANDRÉS CORDERO; DA SILVA, ALINE ALVES; SILVA, MAKSWELL ALMEIDA; FLORENTINO, PILAR VERAS; TAVARES, PAULA CRISTINA BRÍGIDO; DOS SANTOS, MARLUS ALVES; ÁVILA, VERIDIANA DE MELO RODRIGUES; SILVA, MARCELO JOSÉ BARBOSA; ELIAS, MARIA CAROLINA; MORTARA, RENATO ARRUDA; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. Scientific Reports, v. 7, p. 44978, 2017.
4. DA SILVA, ALINE A.; **TEIXEIRA, THAISE L.**; TEIXEIRA, SAMUEL C.; MACHADO, FABRÍCIO C.; DOS SANTOS, MARLUS A.; TOMIOSSO, TATIANA C.; TAVARES, PAULA C. B.; BRÍGIDO, REBECCA T. E SILVA; MARTINS, FLÁVIA ALVES; SILVA, NADJANIA S. DE LIRA; RODRIGUES, CASSIANO C.; ROQUE-BARREIRA, MARIA C.; MORTARA, RENATO A.; LOPES, DAIANA S.; ÁVILA, VERIDIANA DE MELO RODRIGUES; SILVA, CLAUDIO V. DA . Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, p. 1-9, 2017.
5. GIMENES, SARAH N. C.; LOPES, DAIANA S.; ALVES, PATRÍCIA T.; AZEVEDO, FERNANDA V. P. V.; VECCHI, LARA; GOULART, LUIZ R.; RODRIGUES, THAIS C. S.; SANTOS, ANDRÉ L. Q.; BRITES, VERA L. DE C.; **TEIXEIRA, THAISE L.**; DA SILVA, CLÁUDIO V.; DIAS, MATHEUS H.; TEIXEIRA, SAMUEL C.; RODRIGUES, RENATA S.; YONEYAMA, KELLY A. G.; OLIVEIRA, RICARDO A.; RODRIGUES, VERIDIANA DE M. Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. Scientific Reports, v. 7, p. 7077, 2017.
6. RODRIGUES, ADELE A.; NOTÁRIO, ANA FLÁVIA O.; **TEIXEIRA, THAISE L.**; SILVA, REBECCA T.E; QUINTAL, AMANDA P.N.; ALVES, ROSIANE N.; BRÍGIDO, PAULA C.; SIQUEIRA, CARLA S.; MARTINS, FLÁVIA A. ; MACHADO, FABRÍCIO C.; CLEMENTE, TATIANA M.; SILVA, ALINE A. DA; BORGES, BRUNA C.; TEIXEIRA, SAMUEL C.; SANTOS, MARLUS A. DOS; SILVA, CLAUDIO V. DA . A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. Acta Tropica, v. 157, p. 42-53, 2016.
7. DE ARAÚJO, KARINE CANUTO LOUREIRO; **TEIXEIRA, THAISE LARA**; MACHADO, FABRÍCIO CASTRO; DA SILVA, ALINE ALVES; QUINTAL, AMANDA PIFANO NETO; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA. AFAP-1L1-mediated actin filaments crosslinks hinder *Trypanosoma cruzi* cell invasion and intracellular multiplication. Acta Tropica, v. 162, p. 167-170, 2016.
8. NUNES, BRUNO C.; MARTINS, MÁRIO M.; CHANG, ROBERTO; MORAIS, SÉRGIO A.L.; NASCIMENTO, EVANDRO A.; DE OLIVEIRA, ALBERTO; CUNHA, LUÍS C.S.; DA SILVA, CLAUDIO V.; **TEIXEIRA, THAISE L.**; AMBRÓSIO, MARIA A.L.V.; MARTINS, CARLOS H.G.; DE AQUINO, FRANCISCO J.T. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. Industrial Crops and Products (Print), v. 92, p. 277-289, 2016.
9. **TEIXEIRA, THAISE LARA**; CRUZ, LILIAN; MORTARA, RENATO ARRUDA; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA . Revealing Annexin A2 and ARF-6 enrollment during *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigote-host cell interaction. Parasites & Vectors, v. 8, p. 493, 2015.
10. **TEIXEIRA, THAISE LARA**; MACHADO, FABRÍCIO CASTRO; ALVES DA SILVA, ALINE; TEIXEIRA, SAMUEL COTA; BORGES, BRUNA CRISTINA; DOS SANTOS, MARLUS ALVES; MARTINS, FLÁVIA ALVES; BRÍGIDO, PAULA CRISTINA; RODRIGUES, ADELE AUD; NOTÁRIO, ANA FLÁVIA OLIVEIRA; FERREIRA, BRUNO ANTÔNIO; SERVATO, JOÃO PAULO SILVA; DECONTE, SIMONE RAMOS; LOPES, DAIANA SILVA; ÁVILA, VERIDIANA MELO RODRIGUES; ARAÚJO, FERNANDA DE ASSIS; TOMIOSSO, TATIANA CARLA; SILVA, MARCELO JOSÉ BARBOSA; DA SILVA, CLAUDIO VIEIRA. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. Scientific Reports, v. 5, p. 16877, 2015.
11. **TEIXEIRA, THAISE L.**; TEIXEIRA, SAMUEL COTA; SILVA, CLAUDIO VIEIRA DA; SOUZA, MARIA A. DE. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. Pathogens and Global Health, v. 108, p. 30-36, 2014.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Avila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 052/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 105/10

Projeto Pesquisa: "Estudos do papel do citoesqueleto de actina, de citocinas e da proteína P21 de *T. cruzi* na evolução para a fase crônica da doença de chagas experimental".

Pesquisador Responsável: Cláudio Vieira da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de maio de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 164/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 077/14

Projeto Pesquisa: "Estudo do efeito inibitório induzido por peptídeos sintéticos sobre as atividades biológicas da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*"

Pesquisador Responsável: Claudio Vieira da Silva.

A solicitação de adendo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: SOLICITAÇÃO DE ADENDO APROVADA.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 28 de outubro de 2014

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