

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Propriedades biológicas das proteínas Galectina-3 e rP21 na infecção por *Trypanosoma*
cruzi in vitro e in vivo

Aline Alves da Silva

Uberlândia
Abril - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Propriedades biológicas das proteínas Galectina-3 e rP21 na infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo*

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

Aline Alves da Silva

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva
Orientador

Uberlândia
Abril – 2019

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

S586p
2019

Silva, Aline Alves da, 1991
Propriedades biológicas das proteínas Galectina-3 e rP21 na infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* [recurso eletrônico] / Aline Alves da Silva. - 2019.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1238>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Chagas, Doença de. 4. Galectina 3. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972, (Orient.) II. 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

Aline Alves da Silva

“Propriedades biológicas das proteínas Galectina-3 e rP21 na infecção por *Trypanosoma cruzi*
in vitro e *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, 24 de abril de 2019.

Profa. Dra. Munira Muhammad Abdel Baqui
(USP)

Prof. Dr. Thiago Souza Onofre
(UNIFESP)

Profa. Dra. Sabrina Royer
(ICBIM-UFU)

Dra. Caroline Martins Mota
(ICBIM-UFU)

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva – orientador
(ICBIM-UFU)

“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério, inclusive os fatos. Ou a ausência deles. Duvida?
Quando nada acontece há um milagre que não estamos vendo.”

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Não basta sonhar, é preciso acreditar, lutar e ser grata por quem esteve presente nos diversos momentos.

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos diárias, por sua constante presença em minha vida e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho!

À minha família, especialmente meus pais e irmão, pelo amor, apoio, confiança e incentivo durante essa jornada.

Ao meu namorado Victor pelo companheirismo, carinho e por estar sempre torcendo por minhas conquistas.

Ao professor Claudio pela oportunidade de crescimento, pela orientação e amizade. Obrigada por contribuir tanto para minha formação profissional.

À família LATRI pela possibilidade de dividir conhecimentos e por serem mais que companheiros de trabalhos. Adele, Bruna, Cassiano, Flávia, Júlia, Mylla, Samuel, Thaise, Marlus, Rafael, Silvany, nada disso seria possível sem vocês!

Agradeço também aos amigos de trabalho do HC-UFU pela força, ensinamentos e por tornar o serviço mais prazeroso e enriquecedor.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação pelo conhecimento e convívio nesses anos de muito aprendizado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Foi uma caminhada difícil, porém gratificante, com inúmeros aprendizados e superações. Obrigada a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte desses anos de doutorado!

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los”. (Rommel Castro)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representativo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> em hospedeiros invertebrados e vertebrados	19
Figura 2. Obtenção da forma recombinante de P21	44
Figura 3. Ausência ou expressão reduzida de Gal-3 leva a altas taxas de replicação de <i>T. cruzi</i> e maior lise de células do hospedeiro	52
Figura 4. Ausência de Gal-3 leva a altos níveis de fibrose no coração durante a fase crônica de infecção por <i>T. cruzi</i>	54
Figura 5. Participação da Gal-3 na infecção por <i>T. cruzi</i>	56
Figura 6. Camundongos Gal-3 KO apresentaram expressão reduzida de CXCR4	58
Figura 7. rP21 apresentou menor atividade na polimerização de actina em células Gal-3 KO	61
Figura 8. A atividade quimiotática foi maior em células WT tratadas com rP21	63
Figura 9. Tratamento com rP21 diminuiu a multiplicação intracelular em macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO.....	65
Figura 10. Tratamento com rP21 resultou em menores níveis de parasitos extracelulares <i>in vitro</i> e parasitos livres na cavidade peritoneal <i>in vivo</i>	67
Figura 11. Não foi detectado formação de coágulo no plasma após tratamento com rP21	68
Figura 12. Anticorpos anti-P21 podem ser detectados em soros positivos para infecção por <i>T. cruzi</i>	70

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Controles oriundos de kits comerciais de diagnóstico laboratorial de infecção por <i>T. cruzi</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> , utilizados para avaliação da detecção de anticorpos anti-P21 por meio de ELISA	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Amastigotas Extracelulares
CCC	Cardiopatía Chagásica Crônica
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animal
CK18	Citoqueratina 18
CRD	Domínio de Reconhecimento a Carboidratos
CRPs	Proteínas Reguladoras do Complemento
CT	<i>Threshold cycle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DO	Densidade Óptica
DTUs	Discrete Typing Units
EB	Extrato Bacteriano
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
G3CS	Estruturas Contendo Gal-3
Gal-1	Galectina-1
Gal-3	Galectina-3
HRP	Horseradish Peroxidase
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IE	Índice ELISA
IFN- γ	Interferon- γ
IL-12	Interleucina-12

iMoB/6	Macrófagos imortalizados
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LAMP-2	Proteína de Membrana Associada a Lisossomos 2
MAC	Complexo de Ataque a Membrana
MHC I	Complexo de Histocompatibilidade Principal I
MIF	Mediana da Intensidade de Fluorescência
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salino
PI3K	PI3-quinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
rP21	P21 recombinante
RT-PCR	Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i>

SFB	Soro Fetal Bovino
shRNA	<i>Short harpain</i> RNA
TCT	Tripomastigotas de Cultura de Tecido
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador- β
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	Fator de Necrose Tumoral
WT	<i>Wild-Type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2 Interação patógeno-hospedeiro	20
1.3 Resposta imune na infecção por <i>T. cruzi</i>	21
1.4 Doença de Chagas.....	23
1.5 Diagnóstico da Doença de Chagas.....	25
1.6 Componentes do hospedeiro relacionados com a infecção	27
1.7 Galectina-3	28
1.8 Componentes do parasito associados com a virulência e infectividade	31
1.9 Proteína rP21	33
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Aspectos Éticos e Legais	38
4.2 Normas de Biossegurança.....	38
4.3 Animais	38
4.4 Células Vero e iMo/B6	39
4.5 Macrófagos peritoneais.....	39
4.6 Parasitos	39
4.7 Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	40
4.8 Contagem de parasitos extracelulares <i>in vitro</i>	40
4.9 Viabilidade Celular por citometria de fluxo	40

4.10 Infecção de camundongos WT e Gal-3 KO para análise <i>in vivo</i>	41
4.11 Coloração Picrosirius Red	41
4.12 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real.....	42
4.13 Obtenção da forma recombinante da P21	43
4.14 Citometria de fluxo para quantificação de F-actina.....	45
4.15 Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i> por sistema de <i>transwell</i>	45
4.16 Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i> e tratamento com rP21	46
4.17 Contagem de parasitos extracelulares <i>in vitro</i> após tratamento com rP21	46
4.18 Contagem de parasitos livres na cavidade peritoneal <i>in vivo</i>	46
4.19 Detecção de coágulo em plasma e fibrinogênio	47
4.20 Atividade fibrinogenolítica	48
4.21 Detecção de anticorpo anti-P21 em soro por ELISA.....	48
4.22 Análise Estatística.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 A ausência ou expressão reduzida de Gal-3 leva a altas taxas de multiplicação intracelular de <i>T. cruzi</i>	50
5.2 Camundongos Gal-3 KO infectados por <i>T. cruzi</i> apresentaram níveis elevados de fibrose cardíaca	53
5.3 Tecido cardíaco de camundongos Gal-3 KO apresentaram menor expressão de CXCR4.....	57
5.4 rP21 apresentou atividade na polimerização de actina de forma menos expressiva em células Gal-3 KO.....	58
5.5 rP21 exerceu atividade quimiotática de forma mais significativa em macrófagos peritoneais WT.....	62
5.6 Papéis da Gal-3 e rP21 na infecção experimental por <i>T. cruzi</i>	64
5.7 rP21 não promoveu formação de coágulo em plasma	69
5.8 Detecção de anticorpos anti-P21 em soros controles de indivíduos infectados por <i>T. cruzi</i>	72

6. CONCLUSÃO.....	74
7. ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	76
8. REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	102

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado e agente etiológico da doença de Chagas. Estima-se a existência de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo a cardiopatia chagásica a principal manifestação da doença. A Galectina-3 (Gal-3) é uma das proteínas do hospedeiro que tem a expressão aumentada durante a infecção. Esta proteína pertence à família lectina, apresenta afinidade a carboidratos contendo β -galactosídeos e está envolvida em vários eventos biológicos como adesão celular, regulação do ciclo celular, apoptose, sinalização intracelular e resposta imunológica. Já a P21 é uma proteína secretada por *T. cruzi*, está relacionada com a evasão do parasito da resposta imunológica do hospedeiro e garante a permanência de *T. cruzi* no ambiente intracelular. A partir disso, o objetivo do estudo foi avaliar as atividades biológicas da Gal-3 e P21 recombinante (rP21) durante a infecção por *T. cruzi*. Nesse sentido, células *Wild-Type* (WT), galectina-3 *knockout* (Gal-3 KO) e galectina-3 *knockdown* (Gal-3 KD) infectadas por *T. cruzi* foram utilizadas para análise de multiplicação intracelular, lise celular e número de parasitos extracelulares. Nossos dados demonstraram que a ausência ou expressão reduzida de Gal-3 resultou em altas taxas de replicação intracelular, maior lise celular e maior número de parasitos extracelulares. Posteriormente, camundongos WT e Gal-3 KO foram infectados por 90 dias e o tecido cardíaco retirado para coloração com Picrosirius Red e RT-PCR em tempo real. Comparando estes grupos, observamos maior fibrose nos animais Gal-3 KO infectados. Além disso, utilizando a metodologia de RT-PCR notamos a diminuição da expressão do receptor de quimiocina CXCR4 nestes animais. Observado esse cenário, testamos a relação da menor expressão de CXCR4 e as principais atividades biológicas do receptor que estão relacionadas ao controle da infecção. Para isso utilizamos a rP21, que se liga ao receptor CXCR4 e ativa a via de sinalização PI3K, e assim exerce diversas funções como indução de polimerização do citoesqueleto de actina, atividade pró-fagocítica e quimiotática. Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO tratados ou não com rP21 foram usados para análise de polimerização de actina em citômetro de fluxo por meio de marcação com faloidina-TRITC, ensaio de quimiotaxia utilizando sistema de *Transwell* e ensaio de multiplicação parasitária. Vimos que a ausência da Gal-3 levou a redução da polimerização de actina e quimiotaxia, provavelmente pela expressão reduzida do receptor CXCR4 nestas células. Estudamos ainda, por meio de ELISA soros positivos para infecção por *T. cruzi* e vimos que estes podem apresentar anticorpos específicos contra a P21. Além disso, a rP21 é uma proteína

promissora para desenvolvimento de alvos terapêuticos durante a fase aguda de intensa multiplicação parasitária, podendo ser estudada para esses fins, pois além de não apresentar citotoxicidade não promoveu formação de coágulo em plasma. Portanto, relatamos a importância da Gal-3 do hospedeiro e da P21 de *T. cruzi* para polimerização de actina, recrutamento de células e controle da multiplicação parasitária. Dessa forma, esses componentes beneficiam tanto o hospedeiro quanto o parasito, pois diminuem a multiplicação intensa, garantem a sobrevivência do hospedeiro e favorecem a perpetuação parasitária.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Galectina-3, proteína recombinante P21

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a flagellate protozoan and etiological agent of Chagas' disease. It is estimated the existence of 6 to 7 million infected people in the world, being the Chagas' heart disease the main manifestation of the disease. Galectin-3 (Gal-3) is one of the proteins that has increased expression during infection. This protein belongs to the lectin family, has affinity for carbohydrates containing β -galactosides and is involved in several biological events such as cell adhesion, cell cycle regulation, apoptosis, intracellular signaling and immune response. P21 is a protein secreted by *T. cruzi*, is related to the parasite evasion of the host immune response and guarantees the permanence of *T. cruzi* in the intracellular environment. From this, the aim of this study was to evaluate the biological activities of Gal-3 and recombinant protein P21 (rP21) during *T. cruzi* infection. In this sense, Wild-type (WT), galectin-3 knockout (Gal-3 KO) and galectin-3 knockdown (Gal-3 KD) cells infected with *T. cruzi* were used for analysis of intracellular multiplication, cell lysis and number of extracellular parasites. The data presented here demonstrated that the absence or reduced expression of Gal-3 resulted in high intracellular replication rates, increased cell lysis and increased number of extracellular parasites. Subsequently, WT and Gal-3 KO mice were infected for 90 days and cardiac tissue was removed for staining with Picrosirius Red and RT-PCR in real time. Comparing these groups, we observed increased fibrosis in infected Gal-3 KO animals. In addition, using the RT-PCR methodology we noted the decrease in the expression of the CXCR4 chemokine receptor in these animals. Observed this scenario, we tested the relationship of the lower expression of CXCR4 and the main biological activities of the receptor related to infection control. For this, we used the rP21, which binds to the CXCR4 receptor and activates the PI3K signaling pathway, and thus exerts several functions such as induction of actin cytoskeleton polymerization, phagocytic and chemotactic activity. WT and Gal-3 KO peritoneal macrophages treated or not with rP21 were used for actin polymerization analysis on flow cytometer by phalloidin-TRITC labeling, chemotaxis assay using Transwell system and parasite multiplication assay. We have seen that the absence of Gal-3 led to the reduction of actin polymerization and chemotaxis, probably due to the reduced expression of the CXCR4 receptor in these cells. We studied by ELISA the positive sera for infection by *T. cruzi* and we observed that these can present specific antibodies against P21. In addition, rP21 is a promising protein for the development of therapeutic targets during the acute phase of intense parasitic

multiplication. It can be studied for these purposes, as it did not present cytotoxicity and did not promote the formation of a clot in plasma. Therefore, we report the importance of the host Gal-3 and the *T. cruzi* P21 for actin polymerization, cell recruitment and parasite multiplication control. Thus, these components benefit both the host and the parasite, since they decrease the intense multiplication, guarantee the survival of the host and favor the parasitic perpetuation.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Galectin-3, recombinant protein P21

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado e agente etiológico da doença de Chagas, sua classificação o inclui na ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este parasito apresenta três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984); e ciclo de vida heteroxênico, alternando entre hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies) e invertebrado (vetor). Os vetores são insetos hemípteros da família *Reduviidae*, sendo os principais gêneros: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BARRETO, 1979).

O ciclo de vida (Figura 1) inicia quando o vetor ingere formas tripomastigotas de um hospedeiro portador de *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo. Formas tripomastigotas passam para o intestino médio do inseto e multiplicam-se como epimastigotas, que após algumas semanas migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Ao fazer um novo repasto sanguíneo os vetores defecam em um vertebrado e juntamente com as fezes e urina, os parasitos são depositados na pele ou mucosas. Quando os parasitos são depositados na mucosa a penetração ocorre diretamente, no entanto quando são depositados sobre a pele é necessária uma lesão tecidual para que ocorra a penetração, como por exemplo, o ato de coçar o local da picada. Dessa forma, tripomastigotas metacíclicos podem invadir várias células e se diferenciar em amastigotas, que após 20 a 30 horas começam a se multiplicar. Quando a célula está cheia de amastigotas, estes se diferenciam em tripomastigotas e saem da célula hospedeira para o espaço intercelular ou circulação sanguínea. Esses tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, são capazes de invadir macrófagos e novas células de vários tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo dando continuidade ao ciclo (VIANNA, 1911).

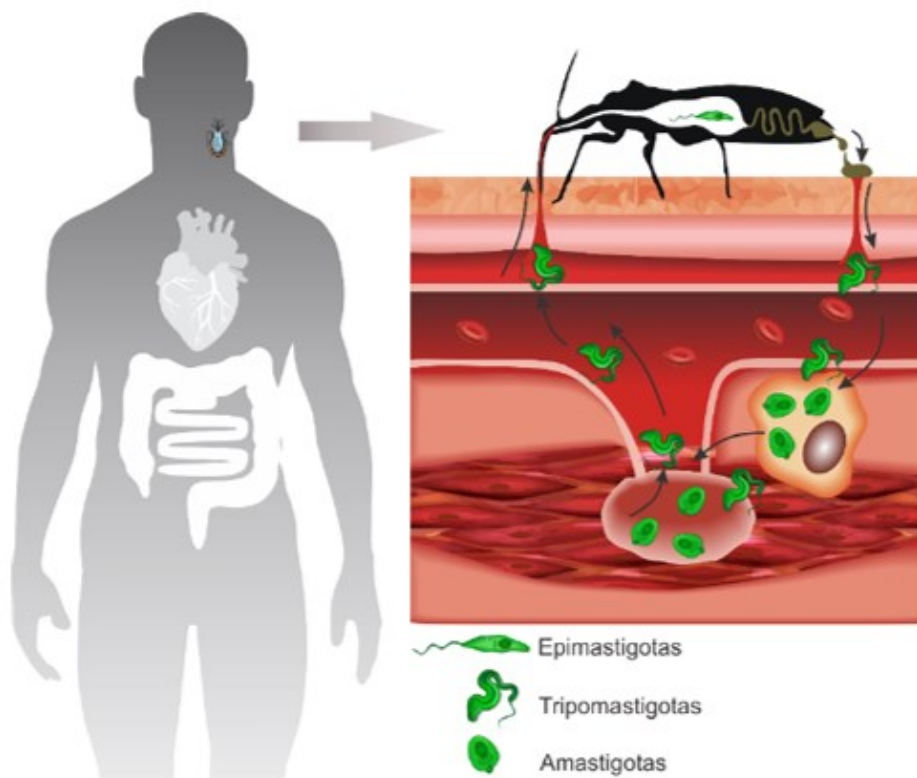


Figura 1. Esquema representativo do ciclo de vida de *T. cruzi* em hospedeiros invertebrados e vertebrados. Fonte: Figura adaptada de DOS SANTOS, M.A., 2017.

Além da transmissão vetorial clássica, a doença de Chagas pode ser transmitida por meio de transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos e por via oral (DIAS, 1992). No Brasil, vários relatos de surtos de contaminação oral pela ingestão de açaí *in natura* e/ou caldo de cana-de-açúcar têm sido notificados às autoridades sanitárias do país, que alertam para uma vigilância e controle maior na manipulação e comercialização destes produtos (STEINDEL *et al.*, 2008; MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

Cepas de *T. cruzi* apresentam heterogeneidade biológica, genética e bioquímica (REVOLLO *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2006). A espécie é subdividida em 7 unidades discretas de tipagem (Discrete Typing Units- DTUs) ou genótipos, *T. cruzi* I a VI e Tcbat, conforme padrão genético, bioquímico e presença de marcadores biológicos. As subpopulações exibem diferenças em relação a parasitemia, tropismo celular, patogenicidade, interação com células e resposta imune do hospedeiro (ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2015).

TcI, TcII, Tc V e TcVI são os principais agentes da doença de Chagas humana na América, e são capazes de causar cardiomiopatia. O genótipo TcI pode ser representado pela cepa G, que possui alta infectividade *in vitro* e não induz infecção patente *in vivo*. Já os genótipos TcII e TcVI, exemplificados respectivamente pelas cepas Y e CL, possuem maior infectividade *in vivo* (ZINGALES *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2015).

1.2 Interação patógeno-hospedeiro

A interação patógeno-hospedeiro envolve vários processos, entre eles a ligação e o reconhecimento do parasito à superfície da célula, seguida por uma cascata de sinalização que culmina na internalização celular (ANDRADE e ANDREWS, 2005; BURLEIGH, 2005; YOSHIDA, 2006).

A entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira pode ocorrer por três mecanismos distintos. A primeira via é a via dependente de lisossomos, que ocorre em cerca de 20% dos processos de internalização. Este mecanismo é iniciado pela sinalização de aumento transitório e localizado dos níveis de Ca^{+} , seguida do recrutamento e fusão de lisossomos no local de adesão do parasito, onde a exocitose localizada de lisossomos fornece membrana para o vacúolo parasitóforo ácido. A segunda alternativa é a via dependente de actina, na qual os parasitos entram na célula hospedeira através de uma expansão da membrana plasmática que culmina na montagem de um vacúolo parasitóforo, com fusão de lisossomos intracelulares. Outro processo de internalização é a via independente de lisossomos, na qual os parasitos internalizam nas células através de invaginações da membrana plasmática que acumulam PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate), produto da ativação de PI3K (TARDIEUX *et al.*, 1992; RODRIGUEZ *et al.*, 1999; BURLEIGH, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2010).

Uma vez dentro da célula hospedeira, tripomastigotas estão contidos em um vacúolo parasitóforo delimitado por membranas, que surge a partir de lisossomos, ou que se funde posteriormente a eles (TARDIEUX *et al.*, 1992; WOOLSEY *et al.*, 2003). Dentro deste vacúolo, um processo de diferenciação do parasito é iniciado, e estes começam a sair para o citoplasma da célula hospedeira após 8 horas de invasão. Depois de cerca de 24 horas do momento de internalização, as formas amastigotas totalmente diferenciadas

começam a se dividir no citoplasma uma vez a cada 12 horas por 3 a 5 dias até a ruptura da célula e liberação de parasitos (LEY *et al.*, 1990; MOTT *et al.*, 2009).

1.3 Resposta imune na infecção por *T. cruzi*

O controle da infecção por *T. cruzi*, tem o envolvimento da resposta imune inata e adaptativa e de vários tipos celulares incluindo células *Natural Killer* (NK), linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos, bem como de anticorpos produzidos por linfócitos B (BRENER e GAZZINELLI, 1997; DOS REIS, 1997; GOLGHER e GAZZINELLI, 2004).

Os receptores *Toll-like* (TLR) são um tipo de receptor de reconhecimento padrão (PRR), os quais estão presentes em todas as células do sistema imune inato e são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) de *T. cruzi*. Uma vez que ocorre ativação de TLR, há o recrutamento de proteínas intracelulares, com posterior ativação de fatores de transcrição e expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferon- γ (IFN- γ) e Interleucina-12 (IL-12), visando o controle da replicação do parasito (JANEWAY, 1998; ABBAS *et al.*, 2002; CAMPOS e GAZZINELLI, 2004; GAZZINELLI e DENKERS, 2006).

A produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, por sua vez, recrutam células fagocíticas para o tecido infectado, as quais são importantes no controle inicial da infecção e modulação subsequente da resposta imune adaptativa (TAKEUCHI e AKIRA, 2010). A IL-12 é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, sendo capaz de atuar em células NK da resposta imune inata e em linfócitos T da resposta imune adaptativa, e induzir a produção de IFN- γ e TNF- α nessas células (MICALLEF *et al.*, 1996; WATFORD *et al.*, 2003). As citocinas IFN- γ e TNF- α podem induzir a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), presente em macrófagos, a sintetizar óxido nítrico (NO), composto tóxico que pode causar a morte de patógenos intracelulares ou inibir sua multiplicação (GAZZINELLI *et al.*, 1992; ABEL *et al.*, 2001; PAVANELLI e SILVA, 2010; ABEL *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que amastigotas da cepa G são altamente infectivos *in vitro*, mas não desenvolvem infecção patente *in vivo* devido sua suscetibilidade à produção

de IFN- γ por células do sistema imune. Camundongos deficientes em IFN- γ e IL-12 apresentaram alta parasitemia. Esses dados são relevantes no sentido de compreender comportamentos diversos em diferentes grupos de *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES *et al.*, 2012b). TLRs tem um papel crítico na resistência do hospedeiro à infecção, associada à produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ , as quais dirigem a resposta imune protetiva, com perfil Th1 (CAMPOS e GAZZINELLI, 2004).

Com a multiplicação intracelular e lise da célula hospedeira, o *T. cruzi* atinge a corrente sanguínea e torna alvo do sistema complemento. Este sistema é constituído de proteínas solúveis que são capazes de interagir com estruturas do parasito e ativar cascata de proteases que levam a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) e lise do patógeno (CARDOSO *et al.*, 2016). Entretanto, *T. cruzi* possui moléculas que atuam bloqueando ou neutralizando as etapas iniciais das vias do complemento (OSORIO *et al.*, 2012; CESTARI *et al.*, 2013).

T. cruzi expõe simultaneamente várias proteínas antigênicas de superfície, como mucinas e trans-sialidades, codificadas por famílias multigênicas altamente polimórficas (TARLETON, 2015). A coexpressão desta variedade antigênica 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).

Antígenos de *T. cruzi* na célula hospedeira tornam-se disponíveis para a apresentação antigênica via complexo de histocompatibilidade principal I (MHC I), por meio da via endógena (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). A apresentação promove resposta de células CD8⁺ altamente eficazes no controle dos níveis de parasitos. Entretanto, este evento ocorre de forma tardia após 5 a 6 dias de infecção, coincidindo com o ciclo de replicação. O atraso acontece devido a necessidade de um número maior de antígenos produzidos por amastigotas ou pela grande variedade de antígenos polimórficos simultaneamente expressos pelo parasito, competindo pela ligação às moléculas de MHC I, que impede a resposta imunológica rápida (ALVAREZ *et al.*, 2008). A medida que a infecção avança, as células T específicas reconhecem 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.

Para melhor entendimento do processo de infecção, estudos envolvendo o recrutamento de leucócitos e a produção de anticorpos específicos contra antígenos parasitários são importantes.

1.4 Doença de Chagas

A apresentação clínica da doença de Chagas é variável, sendo a fase aguda inicial caracterizada por alta parasitemia que pode durar de 40 a 60 dias. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com outras infecções, e por essa razão a doença de Chagas não é frequentemente reconhecida neste estágio. Neste período, as formas amastigotas podem ser vistas no interior de fibras cardíacas, células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos (LARANJA, 1953; WHO, 2018).

Alguns sinais e sintomas podem aparecer nessa fase da doença, como: febre diária, mal-estar, mialgias, astenia, anorexia e cefaleia. O exame físico frequentemente mostra linfadenopatia generalizada, com linfonodos palpáveis em regiões cervicais, axilares e inguinais; e hepatoesplenomegalia moderada. Podendo ser observadas, ainda, manifestações de comprometimento cardíaco e de meningoencefalite. Os sinais sistêmicos geralmente aparecem em torno da segunda ou terceira semana da doença. Além disso, apresenta uma taxa de letalidade de 2 a 10%, observada principalmente em crianças e indivíduos imunodeprimidos que adquirem a infecção por transfusão ou transplante de órgãos. As principais causas de óbito são a miocardite acompanhada de insuficiência cardíaca refratária e meningoencefalite (CHAGAS, 1916; CHAGAS, 1936; DIAS, 1992; WHO, 2018).

Durante a fase crônica, a infecção pode permanecer silenciosa, com ausência de sintomas, mesmo com sorologia positiva em exames de rotina, caracterizando a forma indeterminada da doença. Até 20 anos após a infecção, sinais clínicos da doença e comprometimento visceral como cardiomiopatia ou disfunção no trato digestivo, acometem aproximadamente 35% dos casos. Assim, essa fase pode ser dividida na forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista (cardíaca e digestiva) (WHO, 2002).

A doença cardíaca é a mais importante forma clínica da doença de Chagas devido a sua frequência e gravidade. A patogênese da cardiopatia chagásica crônica (CCC) é complexa e pode estar relacionada com a presença do parasito, mecanismos autoimunes, disfunção autonômica e alterações de microcirculação (COURA *et al.*, 1984; RASSI JR *et al.*, 2009).

A destruição de fibras miocárdicas pela lise de cardiomiócitos induzida pelo parasitismo e pelo processo inflamatório crônico leva substituição destas fibras por colágeno. O processo de fibrose interfere na propagação do impulso elétrico cardíaco gerando uma insuficiência cardíaca progressiva (ANDRADE, 1999). Além das lesões celulares que ocorrem nas miocélulas cardíacas e nos neurônios, o sistema nervoso autonômico também é acometido. Frente a perda progressiva de fibras miocárdicas há o remodelamento ventricular, inicialmente por meio da hipertrofia de fibras íntegras e, posteriormente, dilatação da cavidade ventricular. Essa hipertrofia extrínseca restaura temporariamente o volume sistólico já comprometido, mas a dinâmica do processo leva à dilatação cardíaca crescente, com perda progressiva da capacidade de ejeção ventricular em virtude da evolução da miocardite e da sobrecarga mecânica. Nos estágios mais avançados, também se intensifica a restrição diastólica, devido à grande dilatação e enrijecimento do coração pela fibrose (MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Alterações de marcadores moleculares de ativação do sistema de coagulação foram descritas em indivíduos infectados por *T. cruzi* com ou sem trombose clínica (BERRA *et al.*, 2005; PINAZO *et al.*, 2011). A formação de trombos é frequentemente encontrada na doença de Chagas, os trombos podem desprender ou se fragmentar e formar êmbolos. Ao migrar pela corrente sanguínea os êmbolos obstruem e prejudicam a circulação, o que pode acarretar em infarto do miocárdio, embolia de pulmões, rins, baço e encéfalo (RIBEIRO *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2011; REGUEIRO *et al.*, 2013).

A forma digestiva da doença de Chagas afeta aproximadamente 10% dos indivíduos infectados e é clinicamente caracterizada por megaesôfago e megacólon. Casos raros de megaestômago, megaduodeno e estenose hipertrófica de piloro podem ser observados (ROCHA *et al.*, 2005; AYO *et al.*, 2013; BESTETTI e RESTINI, 2014). Megaesôfago é uma síndrome de disfagia crônica, conhecida pela população como “mal de engasgo”. Ocorre em decorrência da incoordenação motora da musculatura esofágica, devido ao comprometimento neuronal dos plexos nervosos, com dilatação e/ou

alongamento do órgão. No megacólon em decorrência da destruição de gânglios nervosos há estase e discinesia, que acomete principalmente o reto e sigmoide, levando a alteração de motilidade de esfínteres e incoordenação motora da musculatura do cólon, e consequentemente retardo na progressão do conteúdo fecal (ROCHA *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2007; IANTORNO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2015).

Com relação ao tratamento da doença de Chagas, os agentes terapêuticos disponíveis (Benznidazol e o Nifurtimox) são eficazes apenas na fase aguda da doença e apresentam alta toxicidade (VIOTTI *et al.*, 1994; LAURIA-PIRES *et al.*, 2000; CANÇADO *et al.*, 2002). Pesquisadores demonstram a existência de formas dormentes de *T. cruzi*, que são amastigotas intracelulares não proliferativas, que resistem ao tratamento, e posteriormente podem se transformar em tripomastigotas e invadir novas células. Isso explica o fracasso de compostos altamente citotóxicos para resolver completamente a infecção (SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018). Os efeitos colaterais mais comuns dos medicamentos são dermatites, neuropatia, náuseas, vômitos e diarreia (FILIGHEDDU *et al.*, 2017). Há décadas não são produzidos novos fármacos com maior eficácia e menos efeitos colaterais do que as duas únicas drogas ainda utilizadas no tratamento etiológico da doença de Chagas (SANTOS *et al.*, 2004; HALL e WILKINSON, 2012; MEJIA *et al.*, 2012). Dessa forma, pesquisas que relacionam o agente causador da doença de Chagas e possíveis proteínas envolvidas nesse processo são essenciais para melhor entendimento da infecção e elaboração de futuros alvos terapêuticos.

1.5 Diagnóstico da Doença de Chagas

Exames laboratoriais são utilizados no diagnóstico da doença de Chagas, e as diferentes metodologias podem ser melhores empregadas de acordo com a fase da infecção (LUZ *et al.*, 2016). Na fase aguda da doença é encontrada uma alta taxa de parasito no sangue periférico, dessa forma, o diagnóstico laboratorial pode ser feito por testes parasitológicos, como microscopia direta com a observação de parasito em sangue fresco e por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entretanto, na fase crônica da doença a eficiência do diagnóstico parasitológico e molecular é menor devido à escassez de parasitemia. Assim, o imunodiagnóstico na fase crônica é

amplamente utilizado e visa detecção de anticorpos dos pacientes testados contra complexos antigênicos do parasito (BRASIL *et al.*, 2010).

O diagnóstico da doença de Chagas utiliza principalmente três testes convencionais: Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência e Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA). Esses testes apresentam limitações como reatividade cruzada com outros parasitos e falta de 100% de sensibilidade, portanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a realização de pelo menos dois testes convencionais para um diagnóstico definitivo da infecção por *T. cruzi* (WHO, 2002).

A transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea é uma ameaça real, por isso programas de triagem foram estabelecidos em países endêmicos e o rastreio de doadores de sangue para detecção de infecção por *T. cruzi* é obrigatório na maioria dos países da América Latina. Iniciativas intergovernamentais deflagradas na década de 1990 foram importantes para reduzir essa forma de transmissão, entretanto não houve abrangência em todos os países. Em países não endêmicos, a doença de Chagas é considerada uma infecção emergente por causa do crescente número de imigrantes provenientes da América Latina, e em alguns bancos de sangue não há triagem por meio de exames laboratoriais para diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. Casos de transmissão da doença de Chagas por meio de transfusão sanguínea já foram descritos nos Estados Unidos, Canadá e Espanha, evidenciando a importância da implementação global de testes para identificação de indivíduos infectados (GRANT *et al.*, 1989; CIMO *et al.*, 1993; LEIBY *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2007; FLORES-CHAVEZ *et al.*, 2008; ANGHEBEN *et al.*, 2015).

Dessa forma, a pesquisa de possíveis alvos de diagnóstico e prognóstico contribui para melhor identificação e tratamento da infecção por *T. cruzi*. Considerando os problemas metodológicos presentes nos testes comerciais usados rotineiramente em laboratórios de análises clínicas, o estudo da P21 para diagnóstico e prognóstico da doença de Chagas é de extrema importância uma vez que essa proteína é específica de *T. cruzi*, podendo reduzir reações cruzadas com outros protozoários.

1.6 Componentes do hospedeiro relacionados com a infecção

A invasão por *T. cruzi* envolve múltiplas interações e efeitos sobre a célula hospedeira que facilitam as etapas necessárias para o estabelecimento bem-sucedido da infecção (ANDRADE e ANDREWS, 2005; BURLEIGH, 2005; YOSHIDA, 2006). Antes e durante a entrada, tripomastigotas ativam várias vias de sinalização da célula envolvidas na invasão, incluindo aquelas relacionadas com o aumento de cálcio intracelular (TARDIEUX *et al.*, 1994; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; YOSHIDA, 2006), ativação de fosfatidilinositol-3 quinase (CHUENKOVA *et al.*, 2001; WILKOWSKY *et al.*, 2001; WOOLSEY *et al.*, 2003) e AMP cíclico (RODRIGUEZ *et al.*, 1999).

A citoqueratina 18 (CK18) está presente na superfície de células do hospedeiro e tem papel como receptor de *T. cruzi*. Estudos demonstram que Tc85 do parasito pode se ligar a CK18, levando a ativação da cascata de sinalização ERK1/2 e aumento da replicação parasitária no interior de células. Além disso, anticorpos anti-CK18 ocasionam a diminuição da adesão de tripomastigotas (MAGDESIAN *et al.*, 2001; MAGDESIAN *et al.*, 2007; CLASER *et al.*, 2008).

Outra molécula presente na superfície de células hospedeiras e envolvida na entrada de tripomastigotas é o receptor de TGF. A transdução de sinal através deste receptor facilita a entrada de *T. cruzi* em células epiteliais. É sugerido que *T. cruzi* pode apresentar em sua superfície ou secretar moléculas semelhantes ao TGF- β , que é capaz de atuar como agonista, ligando-se ao receptor na membrana plasmática da célula hospedeira e contribuindo para a invasão do parasito (MING *et al.*, 1995; SCHARFSTEIN e MORROT, 1999; HALL e PEREIRA, 2000).

Os receptores de bradicinina também são usados por tripomastigotas para penetrar nas células de mamíferos. Eles são acoplados à proteína heterotrimérica G e são formados por dois subtipos: o receptor de bradicinina 2, que é constitutivamente expresso por células cardiovasculares, e o receptor de bradicinina 1 cuja expressão é regulada nos tecidos lesados (SCHARFSTEIN e MORROT, 1999). A cruzipaina é a principal protease de cisteína presente em todos os estágios de *T. cruzi* e tem sido implicada no processo de internalização devido à sua capacidade de gerar bradicinina. Através do receptor de bradicinina do tipo 2, os tripomastigotas desencadeiam aumento de cálcio intracelular e aumento da entrada de parasitos (NEIRA *et al.*, 2002).

O estudo de proteínas das células hospedeiras envolvidas nas múltiplas interações com *T. cruzi*, é fundamental para melhor compreensão da infecção. Dessa forma, o presente trabalho visa investigar o papel da proteína do hospedeiro galectina-3 frente a infecção por *T. cruzi*.

1.7 Galectina-3

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e podem reconhecer monossacarídeos, oligossacarídeos e resíduos de carboidratos presentes em moléculas como glicoproteínas e glicolipídeos (LIS e SHARON, 1998). As galectinas são pertencentes à família das lectinas, possuem afinidade por β -galactosídeos e podem ser encontradas na matriz extracelular, superfície celular e no meio intracelular (citoplasma e núcleo) (MENON e HUGHES, 1999; HOUZELSTEIN *et al.*, 2004; LEFFLER *et al.*, 2004; FUNASAKA *et al.*, 2014).

Dentre as galectinas, a mais estudada é a galectina-3 (Gal-3) que possui peso molecular de aproximadamente 30 kDa (kilodalton). Em solução encontra-se como um monômero de 3 motivos estruturais: sendo um domínio N-terminal, contendo um resíduo de serina que é alvo de fosforilação, uma região que contém várias repetições em tandem de segmentos de aminoácidos curtos (Prolina-Glicina-Alanina-Tirosina), e um domínio C-terminal que contém o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD- *Carbohydrate Recognition Domain*) (BARONDES *et al.*, 1994; LIU e RABINOVICH, 2005; ÇAY, 2012). O domínio rico em glicina e prolina, está relacionado à capacidade da Gal-3 de se oligomerizar com outras moléculas de Gal-3 ou estabelecer interações com diversas outras proteínas (IPPEL *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014).

Gal-3 é codificada pelo gene *LGALS3*, localizado no cromossomo 14, locus q21-22, e em humanos é composto por 6 éxons e 5 íntrons (RAIMOND *et al.*, 1997; KADROFSKE *et al.*, 1998). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs, do inglês single nucleotide polymorphism), com uma só modificação de base, pode levar a alterações nos níveis séricos de Gal-3 (HU *et al.*, 2011). Este polimorfismo pode explicar diversidades clínicas apresentadas em indivíduos diferentes, segundo Belmont e colaboradores (2016), há uma relação entre SNPs associados a menores níveis séricos de Gal-3 e maior suscetibilidade para infecções do trato respiratório e crises vaso-oclusivas.

Após sua síntese, a Gal-3 é armazenada no citoplasma e sob diferentes estímulos, como dano tecidual e infecção, é ativamente secretada para o meio extracelular ou liberada passivamente por morte celular. Os efeitos desta lectina podem ser decorrentes da Gal-3 extracelular que pode se ligar a receptores de membrana da célula, ou por Gal-3 intracelular que modula a atividade de proteínas dentro da célula (SATO *et al.*, 2009).

A Gal-3 está envolvida em vários eventos biológicos como adesão celular, regulação do ciclo celular, apoptose, sinalização intracelular e resposta imunológica (DUMIC *et al.*, 2006; SALOMONSSON *et al.*, 2010). Na resposta imune, a lectina está relacionada a muitos processos, incluindo o reconhecimento de estruturas de patógenos, podendo ser considerado um receptor de reconhecimento de padrões (PRR); a adesão e ativação de neutrófilos, quimiotaxia de macrófagos e opsonização de neutrófilos apoptóticos (KUWABARA e LIU, 1996; SANO *et al.*, 2000; KARLSSON *et al.*, 2009). A função extracelular dessa proteína é dependente da propriedade lectina do domínio C-terminal, podendo ser inibida por ligantes sacarídicos específicos como a lactose (SANO *et al.*, 2000). Pode ser encontrada em diversos tecidos, como trato digestivo e urogenital, pulmões, sangue, rins e coração; e é presente no núcleo, citoplasma, superfície celular e pode ser secretada para o meio extracelular (CHEN *et al.*, 2016; KOBAYASHI *et al.*, 2014; NISHI *et al.*, 2007; SACCON *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2016).

A partir de uma revisão da literatura é possível observar que as funções da Gal-3 diante de diferentes infecções ainda não são bem entendidas e dependem da sua localização e da interação com outras proteínas ou células. Em infecções com *Streptococcus pneumoniae*, camundongos galectina-3 *knockout* (Gal-3 KO) desenvolveram pneumonia mais severa, com maiores bacteremia e danos no pulmão quando comparados com animais *wild-type* (WT) (FARNWORTH *et al.*, 2008). A Gal-3 demonstrou ter também atividade antimicrobiana contra o fungo patogênico *Candida albicans* e a bactéria *S. pneumoniae* (KOHATSU, *et al.* 2006; FARNWORTH *et al.*, 2008). Foi observado que a infecção de células epiteliais gástricas por *Helicobacter pylori* induz a secreção de Gal-3, a qual demonstrou ser importante para captura da bactéria, e dessa forma, impede a fixação e infecção destas, ademais, camundongos Gal-3 KO apresentaram maiores cargas bacterianas (PARK *et al.*, 2016). Na infecção por *Toxoplasma gondii*, animais deficientes em Gal-3 também apresentaram uma maior carga parasitária (BERNARDES *et al.*, 2006).

Estudos mostram que a Gal-3 é capaz de interagir com proteínas de superfície de tripomastigotas de *T. cruzi*, como a mucina Tc45, e esse acontecimento pode ser inibido pela lactose. Além disso, foi demonstrado que a expressão de Gal-3 é requerida para adesão de tripomastigotas às células, e que com a ligação de Gal-3 exógena à superfície do parasito e à superfície de células musculares há um aumento das taxas de adesão. Foi visto também que a infecção por *T. cruzi* aumenta a expressão de Gal-3 no hospedeiro e de seus ligantes (MOODY *et al.*, 2000; KLESHCHENKO *et al.*, 2004; VRAY *et al.*, 2004).

Em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que a Gal-3 desempenha um importante papel no tráfego intracelular de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais. Observamos recrutamento de Gal-3 e actina nos tempos iniciais correspondentes aos sítios de entrada do parasito nas células. Esse recrutamento se prolongou até o tempo de 6 horas, onde houve uma polarização da Gal-3 em uma das extremidades do parasito formando estruturas contendo Gal-3 (galectin-3-containing structures - G3CSs). Observamos que a formação de G3CS era concomitante com o desaparecimento da Proteína de Membrana Associada a Lisossomos 2 (LAMP-2), portanto, essa estrutura pode ser considerada um marcador de lise de vacúolo parasitóforo de *T. cruzi* (MACHADO *et al.*, 2014). A formação de G3CS não foi observada em vacúolos contendo esferas fluorescentes, confirmando sua presença apenas em eventos de lise de vacúolo (REIGNAULT *et al.*, 2014).

Em trabalhos anteriores notamos que camundongos Gal-3 KO infectados com *T. cruzi* por 15 dias (fase aguda) apresentaram níveis basais das citocinas TNF- α e IFN- γ , aumento de IL-4 e menor recrutamento de leucócitos para o local da infecção. Com isso, a deficiência de Gal-3 leva a maiores níveis de: parasitemia e número de parasitos viáveis na cavidade peritoneal. Na fase crônica da infecção (90 dias) em animais Gal-3 KO percebe-se diminuição da citocina IL-4 e aumento de mastócitos no tecido cardíaco (DA SILVA *et al.*, 2017).

Baseado nesses achados, investigamos o papel da Gal-3 na progressão da infecção por *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro*. A hipótese de que a falta de Gal-3 pode estar relacionada com a maior replicação parasitária e parasitemia, mostra que a aquisição destes conhecimentos é de grande importância para melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

1.8 Componentes do parasito associados com a virulência e infectividade

A virulência de *T. cruzi* envolve a capacidade de penetrar nos epitélios, invadir células e proliferar, evadindo da resposta imune do hospedeiro vertebrado (ANDRADE e ANDREWS, 2005). Moléculas do parasito podem atuar de forma sequencial e combinada durante as diferentes fases do ciclo de vida. Os tripomastigotas metacíclicos invadem principalmente macrófagos locais, fibroblastos e outros tecidos mesenquimais no local da infecção primária, onde devem expressar moléculas para resistir ao estresse oxidativo. Após a multiplicação e transformação em tripomastigotas, os parasitas devem resistir à resposta imune humoral e à lise mediada pelo complemento. Para continuar o ciclo de vida, eles têm que iniciar novas rodadas de invasão, exigindo moléculas que lhes permitam aderir e ativar cascatas de sinalização que resultarão em uma eficiente invasão celular (EPTING *et al.*, 2010; OSORIO *et al.*, 2012).

A internalização de parasitos e multiplicação em células hospedeiras é um passo importante na evolução de vários patógenos. Este processo constitui uma proteção contra a resposta imune do hospedeiro e o acesso a um microambiente rico em produtos metabólicos (BARRIAS *et al.*, 2012). As glicoproteínas gp82 e gp 35/50 são específicas de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, estão presentes na superfície e possuem propriedades de adesão e invasão de células hospedeiras. A gp82 se liga à célula alvo e ativa vias de sinalização intracelular provocando mobilização de Ca^{2+} (RAMIREZ *et al.*, 1993; YOSHIDA, 2006).

A superfície do parasito é coberta por uma camada de glicoconjugados do tipo mucina. Essas moléculas são importantes para fornecer proteção frente ao vetor e frente a mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado, e assegurar o direcionamento e a invasão de células específicas. As moléculas de superfície gp35/50 protegem os tripomastigotas metacíclicos da destruição durante a infecção por via oral, por serem resistentes à digestão por proteases. A ligação da gp35/50 à célula hospedeira provoca liberação transiente de Ca^{2+} de acidocalcissomas por um mecanismo dependente de AMP cíclico gerado por ativação de adenil ciclase. Este aumento de Ca^{2+} medeia a invasão pelo recrutamento de F-actina, configurando uma internalização por processo endocítico (FERREIRA, *et al.*, 2006; YOSHIDA, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2010).

Outro componente importante do parasito é a cruzipaina, uma cisteína protease envolvida na invasão celular de Tripomastigotas de Cultura de Tecido (TCTs). Esta protease é secretada pelo parasito e tem como substrato o cininogênio do hospedeiro, que na presença de cruzipaina, libera cininas ativas, como a bradicinina, que ao se ligar ao seu receptor inicia aumento transiente de Ca^{2+} intracelular (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; GUIÑAZÚ *et al.*, 2007; MAEDA *et al.*, 2014). A Oligopeptidase B também é relevante para o parasito, uma vez que esta peptidase alcalina presente apenas em tripomastigotas gera um fator solúvel agonista de Ca^{2+} , ativando a fosfolipase C do hospedeiro e gerando IP3, que promove a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (BURLEIGH; ANDREWS *et al.*, 1997; OSORIO *et al.*, 2012). Além destas proteínas, a gp83 também está relacionada ao aumento da entrada de tripomastigotas em células do hospedeiro, e ocorre em decorrência da ativação da proteína quinase C (VILLALTA *et al.*, 1999).

Entre os membros da família Tc-85, a melhor caracterizada é a gp85, uma glicoproteína de superfície expressa por TCTs e envolvida na invasão de células de mamíferos (ALVES *et al.*, 1986). A gp85 possui sítios de ligação para a laminina e citoqueratinas da célula hospedeira (GIORDANO *et al.*, 1999; TONELLI *et al.*, 2010). Um domínio FLY conservado desta proteína (VTVXNVFLYNR) é capaz de ativar quinases que facilitam a infecção e sobrevivência do parasito (MAGDESIAN *et al.*, 2007). Este domínio se liga às células endoteliais de maneira órgão dependente, particularmente na vasculatura do coração, contribuindo, então, para o tropismo tecidual (TONELLI *et al.*, 2010). *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e utiliza a gp85 para catalisar a transferência deste monossacarídeo de glicoconjugados da superfície de células do hospedeiro vertebrado e transferi-lo para proteínas aceptoras presentes na membrana do parasito, como as mucinas (AGUSTÍ *et al.*, 2007; ARAYA *et al.*, 1994; COLLI e ALVES, 1999). Mucinas sialiladas estão envolvidas na adesão e penetração do parasito às células (MING *et al.*, 1993).

Em relação as proteínas presentes em amastigotas podemos citar as amastinas e a Ssp-4. A primeira é uma glicoproteína que reduz a infectividade de amastigotas extracelulares (AE). Trabalhos relatam que a adição de amastina recombinante causa inibição de invasão de AE em células HeLa. Adicionalmente, a amastina acelera a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas durante o ciclo intracelular (TEIXEIRA *et al.*, 1994; CRUZ *et al.*, 2012). A Ssp-4 (proteína de superfície estágio-específica 4) é uma glicoproteína identificada em amastigotas intra e extracelulares que participa da

invasão celular (ANDREWS *et al.*, 1987), foi demonstrado que amastigotas extracelulares da cepa G apresentaram invasão reduzida quando incubadas com anticorpos monoclonais mAb2C2, anti-Ssp-4 (DA SILVA *et al.*, 2006).

Após a invasão e formação de vacúolos parasitóforos, os parasitos devem escapar destes para replicar no citoplasma da célula hospedeira. A ruptura da membrana do vacúolo e escape do parasito é mediada por uma proteína de *T. cruzi* denominada Tc-tox, que induz formação de poros (ANDREWS *et al.*, 1990; OSORIO *et al.*, 2012). *T. cruzi* deve evadir também do estresse oxidativo de compostos deletérios como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito encontrado no interior do vacúolo fagolisossômico de macrófagos. Para isso, o parasito expressa enzimas antioxidantes, como *TcCPx*, *TcMPx* e *TcAPx* (PIACENZA *et al.*, 2008, 2009; WILKINSON *et al.*, 2002).

Ao ser liberado da célula hospedeira, o parasito circula nos vasos sanguíneos e entra em contato com o sistema complemento, que é um mecanismo crítico de contenção e *clearance* de patógenos. Está bem estabelecido que tripomastigotas são resistentes aos efeitos líticos do complemento, enquanto epimastigotas são rapidamente mortos pela via alternativa (KIPNIS *et al.*, 1981). Esta resistência de tripomastigotas depende de moléculas do parasito, como proteínas reguladoras do complemento (CRPs) e calreticulina (NORRIS *et al.*, 1991). Outro exemplo é a cruzipaína que está envolvida na evasão imune por degradação proteolítica de anticorpos (BERASAIN *et al.*, 2003).

Ao longo da evolução, o parasito desenvolveu estratégias eficientes para evadir do sistema imune e desenvolver uma infecção crônica, garantindo sua sobrevivência. Assim, compreender o papel de proteínas secretadas por *T. cruzi*, como a P21, é fundamental para aprofundar o conhecimento da patogênese da doença de Chagas.

1.9 Proteína rP21

A P21 é uma proteína ubíqua de 21 kDa identificada por nosso grupo de pesquisa como um componente secretado por todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. A forma recombinante da P21 foi produzida por clonagem da sequência gênica da proteína, com a adição de seis resíduos de histidina (*tag*), em vetor plasmidial pET-28a (+), amplificada em bactérias *Escherichia coli*, e purificada por cromatografia de afinidade com o uso de coluna de níquel (SILVA *et al.*, 2009). A padronização da purificação e renovelamento

da P21 recombinante (rP21) possibilitou a investigação dos papéis exercidos por essa proteína (SILVA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2014).

Como citado anteriormente, cepas de *T. cruzi* apresentam heterogeneidade biológica, genética e bioquímica (REVOLLO *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2006). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que os níveis de expressão de P21 é diferente entre as cepas e formas evolutivas deste parasito. Amastigotas e epimastigotas das cepas CL, RN-19 e Y apresentaram menor expressão dos alelos da P21, enquanto a cepa G apresentou maior expressão. Em contrapartida, a cepa G possui características de baixa infectividade *in vivo* e ausência de parasitemia (FERNANDES, 2013).

Estudos realizados também pelo nosso grupo mostraram que a adição da rP21 durante a invasão de amastigotas e tripomastigotas em células não fagocíticas provocou um aumento da internalização de parasitos (SILVA *et al.*, 2009). Além disso, foi visto que a proteína aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos não só na presença de *T. cruzi*, mas também na presença de outros protozoários, como *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii*; e até mesmo de partículas inertes de zymosan (glicano presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*). Esta atividade da rP21 ocorre de forma dependente da ligação ao receptor de quimiocinas CXCR4 e ativação da via de sinalização PI3-quinase (PI3K). Outra atividade observada foi na indução da polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira (RODRIGUES, 2011; CLEMENTE, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012a).

O papel do citoesqueleto de actina durante a infecção experimental por tripomastigotas de *T. cruzi* foi observado em macrófagos e mioblastos tratados com IFN- γ ou rP21. Para isso foi realizado a análise de multiplicação parasitária, bem como a observação da polimerização de actina. Como resultado, tanto as células tratadas com IFN- γ quanto com rP21, apresentaram maior polimerização do citoesqueleto e menor multiplicação intracelular (MARTINS, 2015).

Trabalho realizado com um modelo de inflamação por implante de esponja de poliestireno no dorso de camundongos tratados ou não com rP21, mostrou que a proteína tem ação pró-inflamatória, elevada atividade quimiotática e alta atividade anti-angiogênica (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Esta proteína recombinante não altera a adesão ou viabilidade de células endoteliais e não apresenta atividade proteolítica nos componentes

da matriz extracelular, entretanto, ela é capaz de inibir fortemente a formação de vasos sanguíneos. A ação anti-angiogênica da rP21 ocorre devido a inibição da proliferação de células endoteliais, diminuição da expressão de ezrina e do receptor VEGFR-1 e aumento de sFlt-1 (TEIXEIRA *et al.*, 2017). A descoberta de proteínas com função anti-angiogênica é importante para o tratamento, por exemplo, de tumores. Pesquisas anteriores demonstraram que em células imortalizadas e tratadas com rP21 foi observado a redução do volume de tumores de Ehrlich em 7 dos 8 animais tratados, devido à modulação do microambiente tumoral, reduzindo o crescimento do tumor (BORGES, 2015).

O conjunto de resultados mostram que a rP21 possui diferentes propriedades. Em relação a infecção por *T. cruzi*, esta proteína desempenha um papel importante para evasão do parasito da resposta imunológica do hospedeiro. Sua atividade quimiotática, pró-fagocítica e indutora de polimerização de actina garante a permanência de *T. cruzi* no ambiente intracelular. Dessa forma, pesquisas envolvendo a atividade da P21 são importantes para maior entendimento do processo de infecção e podem contribuir para o desenvolvimento de alvos terapêuticos das fases aguda e crônica da doença de Chagas.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo protozoário, principalmente na América Latina, causando mais de 10 mil mortes anualmente (WHO, 2018). No Brasil são aproximadamente 2 a 3 milhões de pessoas vivendo com a doença de Chagas (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

A doença de Chagas é considerada um problema de saúde pública mundial, com diversos casos notificados em países considerados não endêmicos, como Espanha e Estados Unidos, dentre outros destinos dos imigrantes latinos (RASSI e NETO, 2010). No Brasil foram relatados diversos surtos de doença de Chagas por via oral (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012).

Os efeitos incapacitantes e a mortalidade da doença de Chagas têm sido um dos mais sérios problemas de saúde, sendo responsável pela perda de produtividade a um custo estimado de US\$ 1,2 bilhão por ano na América Latina. Além da perda de produtividade, os custos médicos para o tratamento de indivíduos infectados que desenvolvem patologia cardíaca ou digestiva grave são várias vezes maiores que essa quantia, em decorrência da morbidade, da hospitalização e do tratamento dos sintomas (MONCAYO e SILVEIRA, 2009; WHO, 2018). O tratamento e distribuição dos medicamentos de todas as doenças negligenciadas é de responsabilidade federal, portanto do Ministério da Saúde (MS). Estima-se que 30% das pessoas infectadas desenvolva a forma cardíaca da doença de Chagas, que é responsável pela elevada morbimortalidade. A doença pode evoluir para miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva (ICC), podendo ser necessário tratamentos de alto custo, como transplante cardíaco, uso de desfibrilador e marca-passo, evidenciando o elevado impacto econômico da enfermidade durante a fase crônica (BRASIL, 2005, 2009; ANDREOLLO e MALAFAIA, 2009). Na Colômbia, o ônus econômico para cuidado médico de pacientes com a doença é de aproximadamente US\$267 milhões por ano, e os gastos com atividades de pulverização custam cerca de US\$5 milhões, ou aproximadamente 2% do gasto anual esperado com os cuidados à saúde (WHO, 2018).

A literatura já relata o envolvimento de proteínas do hospedeiro e proteínas do parasito no desfecho da doença. Nesse contexto, considerando os surtos da doença e a falta de um tratamento eficaz, pesquisas básicas com proteínas que participam no processo de infecção, são de grande relevância no cenário atual e pode contribuir para um maior entendimento da patologia e o desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da proteína Galectina-3 presente no hospedeiro e da proteína P21 secretada por *T. cruzi* no processo de infecção por *T. cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar a importância da galectina-3 durante a replicação, lise celular e liberação de parasitos extracelulares de *T. cruzi*.
2. Comparar o nível de fibrose em camundongos WT e Gal-3 KO infectados.
3. Verificar a expressão gênica de CXCR4 em coração de camundongos WT e Gal-3 KO.
4. Avaliar a polimerização do citoesqueleto de actina em macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO tratadas ou não com a proteína rP21.
5. Analisar o efeito quimiotático da rP21 em células WT e Gal-3 KO.
6. Observar o efeito do tratamento com rP21 na multiplicação de *T. cruzi* em células WT e Gal-3 KO.
7. Testar o impacto da rP21 na coagulação em plasma e fibrinogênio.
8. Verificar a detecção de anticorpos anti-P21 em soro de indivíduos infectados por *T. cruzi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e Legais

Este estudo faz parte dos projetos intitulados: “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”, (Protocolo número 105/10); e “Papel de anticorpos ScFv na inibição das atividades biológicas da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* *in vivo* e *in vitro*”, (Protocolo número 018/15), aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU).

Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Tripanosomatídeos (Bloco 2B sala 200), Bioquímica e Toxinas Animais (Bloco 2E sala 227) e Histologia (Bloco 2B), da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2 Normas de Biossegurança

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

4.3 Animais

Camundongos C57BL/6 *wild-type* (WT) e galectina-3 *knockout* (Gal-3 KO) foram mantidos em biotério em condições padrões de 12 horas de luz-12 horas na ausência de luz, em temperatura de 25 ± 2 °C, com alimento e água “*ad libitum*”. Camundongos machos ou fêmeas de 6 a 8 semanas foram utilizados nos experimentos. A manutenção e manipulação dos animais foram de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animal (CEUA), UFU.

4.4 Células Vero e iMo/B6

Células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram utilizadas para manutenção e obtenção *in vitro* de tripomastigotas de cultura de tecido de *T. cruzi*.

Macrófagos imortalizados (iMoB/6) provenientes de medula óssea de fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6 foram usados nos ensaios. As células foram transduzidas com partículas de lentivírus contendo *short harpain* RNA (shRNA) de acordo com instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA). Controle shRNA (sc-108080) e Galectina-3 shRNA (sc-35443) foram utilizados. Após a transdução, as células WT, controle *knockdown* (CTRL KD) e Gal-3 *knockdown* (Gal-3 KD) foram analisadas por citometria de fluxo para verificar a expressão de Gal-3, conforme descrito por Araújo *et al.* (2016).

As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) contendo L-glutamina and D-glucose (4500 mg/l), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), e suplementado com tampão HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio, 10% soro fetal bovino (SFB) e complexo de três antibióticos: penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L). As garrafas de cultura foram mantidas em estufa de CO₂ (5% de CO₂) a 37°C.

4.5 Macrófagos peritoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais, 1 mL de meio tioglicolato 4 % foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 com o objetivo de induzir inflamação. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados e uma lavagem peritoneal foi realizada com 4 mL de meio DMEM gelado. Macrófagos peritoneais coletados foram contados em câmara de Neubauer e utilizados nos ensaios.

4.6 Parasitos

Neste estudo utilizamos tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas CL, G e Y mantidos em células Vero e meio DMEM suplementado com 2,5% de soro fetal bovino a 37°C e 5% de CO₂.

4.7 Ensaio de multiplicação *in vitro*

iMo/B6 WT, CTRL KD e Gal-3 KD; e macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados (10^5 células/poço) e deixados aderir *overnight* em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares (13 mm). Posteriormente, as células plaqueadas foram desafiadas com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa CL na proporção de 5 parasitos por célula. Após duas horas de infecção, os poços foram lavados 3 vezes com *Phosphate Buffer Saline* (PBS), para remover os parasitos não internalizados.

Para análise de multiplicação, as células foram fixadas por 15 minutos com solução Bouin nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 150 horas para iMo/B6 e nos tempos de 96 e 150 horas para macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO, lavadas exaustivamente em PBS e então coradas com Giemsa (1:20) por 40 minutos. As lamínulas foram desidratadas com o uso de acetona em concentrações decrescente e xilol em concentrações crescentes e coladas em lâminas de vidro com Entelan (Merck). Para a avaliação da importância da Gal-3 durante a multiplicação do parasito, foi feita a contagem do número de parasitos internalizados em um total de 100 células infectadas/lamínula. O experimento foi realizado 3 vezes em triplicata.

4.8 Contagem de parasitos extracelulares *in vitro*

Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados em placas de 24 poços (10^5 células/poço) *overnight* e incubados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa CL na proporção de 5 parasitos por célula. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remover os parasitos não internalizados. O número de parasitos liberados no meio extracelular (sobrenadante) 96 horas pós-infecção foi contado em câmara de Neubauer.

4.9 Viabilidade Celular por citometria de fluxo

A viabilidade de macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO infectados ou não por *T. cruzi* foi avaliada por meio de citometria de fluxo. As células foram plaqueadas (5×10^5 células/poço) em placas de 6 poços *overnight* e incubadas com tripomastigotas de *T. cruzi*,

na proporção de 5 parasitos por célula. Depois de 2 horas de infecção, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remover os parasitos não internalizados. Após 96 horas, as células foram coletadas por tripsinização e incubadas com 500 µL de iodeto de propídio (50µg/mL) por 30 minutos, lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora. As amostras foram analisadas no FACSCantoII (BD) e os resultados foram obtidos utilizando o software FlowJo (versão 7.6.3). Os dados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de iodeto de propídio.

4.10 Infecção de camundongos WT e Gal-3 KO para análise *in vivo*

Camundongos C57BL/6 WT e Gal-3KO de seis a oito semanas de idade, foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa CL (10^5 parasitos por camundongo). Usando seringa de 1 mL foram inoculados via intraperitoneal (IP) 200 µL da suspensão de parasitos por animal, diluídos em tampão PBS. Um grupo de camundongos não infectados foi utilizado como controle negativo. Foram utilizados 6 animais em cada grupo.

Os animais foram sacrificados 90 dias (fase crônica) pós-infecção. Foi removido cirurgicamente o coração, sendo uma parte do tecido reservada para PCR em tempo real e outra parte foi utilizada para análises histológicas.

4.11 Coloração Picrosirius Red

O coração foi processado para análise histológica com o objetivo de avaliar o nível de fibrose, por meio de coloração com Picrosirius Red, que permite distinção de fibras de colágeno depositada no tecido cardíaco dos diferentes grupos analisados (KYLE *et al.*, 2017).

Os órgãos foram fixados em formaldeído (10% em PBS), posteriormente desidratados em álcoois de crescentes concentrações, diafanizados em xilol e finalmente incluídos em parafina. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura e colocados em lâminas de vidro. Subsequentemente, as lâminas foram processadas para coloração.

Os cortes foram submetidos a desparafinação em três banhos sucessivos de um minuto com xilol, hidratados por um minuto em soluções de concentrações decrescentes

de etanol (100%, 100%, 100%, 95%, 85% e 70%). Em seguida, as lâminas foram colocadas em água corrente por 20 minutos e em água destilada por 5 minutos; e então corados, com solução de Picrosirius (Sigma Aldrich) durante 90 minutos e lavados em água destilada. A seguir, os cortes foram colocados em solução de hematoxilina por um minuto, lavados em água corrente por cinco minutos e água destilada por um minuto. Posteriormente, foram desidratados em soluções crescentes de etanol (70%, 85%, 95%, 100%, 100% e 100%) por um minuto. A diafanização foi feita em três banhos de xilol de um minuto cada. A montagem da lâmina foi feita com uso de Entellan®.

Quantificamos o colágeno tipo I e III por meio da intensidade de cor, utilizando o princípio de birrefringência das fibras colágenas. As fibras colágenas tipo I emitem cor vermelha e as fibras colágenas tipo III emitem cor verde, e a sobreposição das cores gera a cor amarela/alaranjada (FREITAS-FILHO *et al.*, 2006). Desta forma, para obtenção de imagens das marcações de colágeno tipo I e III foi utilizado microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse TiS com luz polarizada acoplada ao analisador de imagem digital para a quantificação da área por diferença de cor. As análises foram feitas a partir de 20 campos de cada corte por meio do *software* Image J com a objetiva de 40X. Seguindo os passos:

- 1- Abrir a imagem: File→Open
- 2- Calibrar escala: Analyze → Set Scale → Known distance (100 µm)
- 3- Análises individuais por cores: Image → Color → Split Channel / Image → Type → RGB color
- 4- Selecionar área: Image → Adjust → Color Treshold (Brightness: 65-255)
- 5- Medir área: Analyse → Measure → Results

Os dados foram expressos pela média de marcação de colágeno tipo I e III (em pixels) por campo.

4.12 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica de colágeno tipo I, colágeno tipo III, TGF- β e CXCR4 do tecido cardíaco de camundongos WT e Gal-3 KO foi feita por RT-PCR (Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction) em tempo real. Para extração de

RNA do tecido, foi utilizado o kit de purificação de RNA RiboZol® Plus (Amresco), de acordo com as instruções do fabricante.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita em termociclador (Techne® Endurance TC-312, UK) utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems) e 2 µg de RNA. O protocolo iniciou-se em uma temperatura de 25 °C, mantida durante 10 minutos e seguido por 37 °C durante 120 minutos. Em seguida, as amostras foram aquecidas até 85 °C durante 5 minutos e, finalmente resfriadas a 4 °C. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

A expressão dos genes colágeno tipo I e III, TGF-β e CXCR4 foi feita com o kit SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), utilizando para cada poço de reação 10 µM de primer (0,5 µL forward + 0,5 µL reverse), 4 µL de água, 5 µL de SyB e 2 µL de cDNA (125 ng/µL). A quantificação gênica relativa foi determinada no equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems) e os dados recebidos foram processados usando o Software v1.4.1 SDS (Applied 38 Biosystems). A normalização dos dados se deu pela utilização do GAPDH como gene endógeno/referência (housekeeping gene) e, em seguida, foram analisados por meio do método comparativo de *threshold cycle* (CT) para calcular as alterações na expressão em diferentes grupos. As alterações na expressão gênica foram então calculadas como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Todos os experimentos relativos a RT-PCR foram realizados em triplicadas biológicas e técnicas.

4.13 Obtenção da forma recombinante da P21

A obtenção da P21 recombinante foi realizada como descrito por Silva *et al.*, (2009) e dos Santos *et al.*, (2014) (Figura 2).

Escherichia coli da linhagem BL21 contendo o plasmídeo pET-28a(+) (Novagem) apresentando o gene que codifica a rP21 foram colocadas em meio Luria-Bertani (LB) com o antibiótico de seleção Kanamicina (50 µg/mL) por 18 horas a 37°C e sob agitação. Em seguida, o pré-inóculo foi diluído 1:50 do mesmo meio e incubado a 37°C, com agitação a 150 RPM, até atingir a densidade óptica (OD) de 0,6 a 0,9. Com o objetivo de estimular a expressão da proteína rP21 foi adicionado 1mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Depois de 3 horas de incubação, a solução foi centrifugada 10000 RPM por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em solução de ureia 6M.

Foi acrescentado 10 μL de lisozima a cada 10 mL de material ressuspensionado por 20 minutos para promover a lise bacteriana. Em seguida, foi utilizado o Sonicador Branson Sonifier 450, por 20 ciclos de um minuto com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 20200 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em solução tampão de ureia 6M. A amostra foi incubada com uma resina de níquel *overnight* sob agitação a 4°C. No dia seguinte, a resina foi submetida a: (1) três lavagens em tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M); (2) três lavagens com tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, ureia 6M); (3) quatro eluições com tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M). O imidazol tem grande afinidade pelo níquel, compete com a cauda de histidina da rP21 e retira a proteína recombinante. O material eluído foi dialisado em PBS com uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/Por 131198) por 48 horas sob agitação contínua a 4°C para remoção de resíduos de ureia e promover o renovelamento proteico.

A concentração da amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando-se a técnica de Bradford (Bradford, 1976). Com o intuito de verificar a pureza da rP21 eluída foi realizado gel de SDS-PAGE 13% (Laemmli, 1970) com coloração de Coomassie Blue.

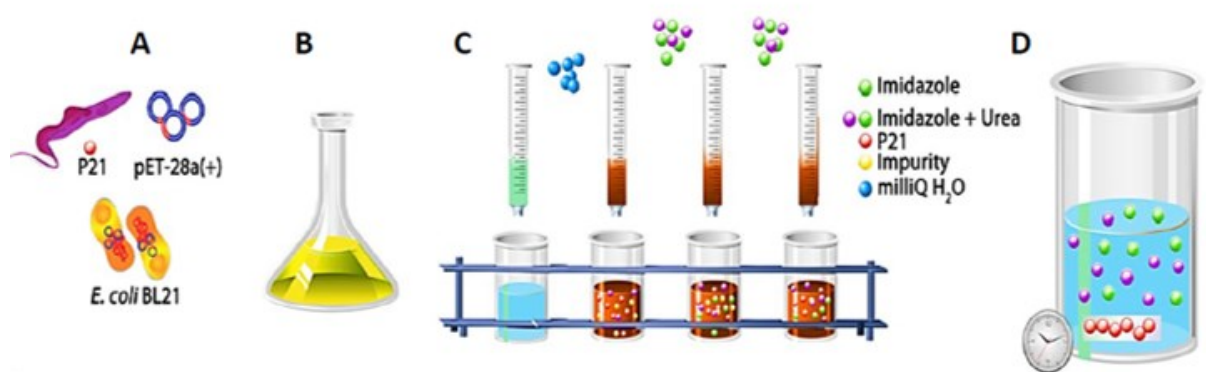


Figura 2. Obtenção da forma recombinante de P21. Inserção de clones do gene da P21 em bactérias *Escherichia coli* (A). Crescimento e lise das bactérias (B). Incubação em coluna de níquel, seguida de lavagens e eluição (C). Diálise em PBS (D). Fonte: DOS SANTOS, M.A., 2017.

4.14 Citometria de fluxo para quantificação de F-actina

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO foram plaqueados em placas de 6 poços (10^6 células/poço) *overnight*. Posteriormente, as células foram infectadas por 2 horas com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa G (5 parasitos/célula). Os poços foram lavados 3 vezes com PBS para remoção de parasitos não internalizados. Para analisar o efeito do tratamento de rP21 na polimerização de actina durante a invasão, foi adicionado 40 $\mu\text{g/mL}$ de rP21 no momento da infecção. Para analisar o efeito da rP21 durante a multiplicação, o tratamento foi feito 2, 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Nos diferentes tempos, as células foram fixadas com formaldeído 4% e lavadas 3 vezes com PBS. A marcação de F-actina foi feita usando faloidina-TRITC (P1951- Sigma Aldrich) diluída 1:1000 em PBS+saponina (0,01%). Após lavar novamente em PBS, as amostras foram analisadas em FACSCantoII (BD) e os resultados foram obtidos usando o *software* FlowJo (versão 7.6.3) e expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

4.15 Ensaio de quimiotaxia *in vitro* por sistema de *transwell*

O ensaio de quimiotaxia de macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO *in vitro* foi realizado por meio do sistema de *transwell*, que apresenta uma membrana de polycarbonato com poros de 8 μm (Chemicon Cell Invasion Assay Kit, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO (10^6 células/poço) foram adicionados na parte superior do *transwell* em meio de cultura DMEM sem SFB. Na parte inferior do *transwell* foi colocado 500 μl de meio em 3 condições: (a) meio DMEM contendo 10% de SFB (controle positivo de migração), meio DMEM sem SFB (controle negativo de migração), e (c) meio DMEM sem SFB contendo 40 $\mu\text{g/mL}$ de rP21. As células foram incubadas por 24 horas. Após esse período, as células que não migraram foram removidas com swab e as células que migraram foram coradas com kit panótico de acordo com as normas do fabricante. Imagens da membrana do *transwell* foram adquiridas e foi feita a contagem do número de células que migraram através da membrana em todas as situações experimentais citadas.

4.16 Ensaio de multiplicação *in vitro* e tratamento com rP21

Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados *overnight* em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares (10^5 células/poço). Posteriormente, as células plaqueadas foram desafiadas com tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Y e G na proporção de 5 parasitos por célula. Depois de duas horas de infecção, os poços foram lavados 3 vezes com PBS, para remover os parasitos não internalizados e foi feito tratamento com 40 µg/mL de rP21 em meio DMEM (volume final de 500 µL), nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas pós-infecção.

Para análise de multiplicação, após 96 horas as células foram fixadas com solução Bouin por 15 minutos, lavadas com PBS e então coradas com Giemsa por 40 minutos. As lamínulas foram desidratadas com o uso de acetona em concentrações decrescente e xilol em concentrações crescentes e coladas em lâminas de vidro com Entelan (Merck). Para a avaliação da importância da Gal-3 e da rP21 durante a multiplicação do parasito, foi feita a contagem do número de parasitos intracelulares em um total de 100 células infectadas/lamínula. O experimento foi feito 3 vezes em triplicata.

4.17 Contagem de parasitos extracelulares *in vitro* após tratamento com rP21

Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados em placas de 24 poços (10^5 células/poço) *overnight* e incubados com tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Y e G na proporção de 5 parasitos por célula. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remover os parasitos não internalizados. Posteriormente, foi feito tratamento com 40 µg/mL de rP21 em meio DMEM (volume final de 500 µL), nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas pós-infecção. O número de parasitos liberados no meio extracelular, 48, 72 e 96 horas pós-infecção, foi contado em câmara de Neubauer.

4.18 Contagem de parasitos livres na cavidade peritoneal *in vivo*

Camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO de seis a oito semanas de idade, foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Y e G (10^5 parasitos por camundongo). Usando seringa de 1 mL foram inoculados via intraperitoneal (IP) 200 µL

da suspensão de parasitos por animal, diluídos em tampão PBS. Após a infecção os animais foram divididos em 4 grupos: (1) WT não tratado com rP21, (2) WT tratado com rP21, (3) Gal-3 KO não tratado com rP21, (4) Gal-3 KO tratado com rP21. Foram utilizados 6 animais por grupo.

O tratamento foi feito via intraperitoneal com 40 µg de rP21 em volume final de 200 µL (PBS), nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas pós-infecção.

Os animais foram eutanasiados 96 horas pós-infecção e uma lavagem peritoneal foi realizada com 4 mL de meio DMEM gelado. O número de parasitos presentes na cavidade peritoneal foi contado em câmara de Neubauer.

4.19 Detecção de coágulo em plasma e fibrinogênio

A atividade coagulante de rP21 foi testada em plasma e fibrinogênio. Para análise em plasma, foi utilizado 150 µL de plasma bovino citratado a 37°C e diferentes quantidades da proteína recombinante. O plasma foi colocado em cubetas no coagulômetro micro-processador Quick-Timer (DRAKE LTDA), que determina o tempo de coagulação por meio da detecção de variação na densidade óptica. Assim que a amostra foi adicionada ao plasma, o aparelho aciona o tempo e registra o momento (em segundos) de detecção de coágulo. Todas as amostras testadas apresentaram um volume final de 50 µL e foram avaliadas as seguintes situações: 10 µg de peçonha de *Bothrops moojeni* diluídos em PBS e em PBS com 0,05M de CaCl₂ (controles positivos de coagulação); 40 e 60 µg de rP21 diluídos em PBS com 0,05M de CaCl₂; 60 µg de rP21 (diluído em PBS e em PBS com 0,05M de CaCl₂) e pré-incubada com 10 µg de peçonha por 30 minutos (para análise de atividade anticoagulante).

Para detecção de coágulo em fibrinogênio utilizou-se 150 µL de fibrinogênio na concentração de 1,5 µg/µL a 37°C. As amostras testadas apresentaram volume final de 50 µL: PBS com 0,05M de CaCl₂ (controle negativo de coagulação); 10 µg de peçonha de *Bothrops moojeni* diluídos em PBS com 0,05M de CaCl₂ (controle positivo de coagulação); 40 e 60 µg de rP21 diluídos em PBS com 0,05M de CaCl₂; 60 µg de rP21 (diluído em PBS e em PBS com 0,05M de CaCl₂) e pré-incubada com 10 µg de peçonha por 30 minutos (para análise de atividade anticoagulante) e 60 µg de Extrato Bacteriano (EB). O EB foi utilizado para demonstrar que os resultados observados não foram

provenientes de contaminação com resíduos bacterianos durante o processo de purificação. Para a obtenção do extrato foi realizado o mesmo protocolo de obtenção da rP21, com exceção da bactéria *E. coli* que não continha o vetor plasmidial específico da P21. Os resultados de detecção de coágulo foram expressos pela unidade de tempo em segundos.

4.20 Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada de acordo com Rodrigues e colaboradores (2000), com modificações. Uma solução de 50 µL de fibrinogênio bovino (1,5µg/µL) foi incubada por 1 hora a 37°C, nas seguintes situações: 10 µg de peçonha de *Bothrops moojeni* (controle positivo); 20 µg de Extrato Bacteriano e 20 µg de rP21. A reação foi interrompida com 25 µL de solução contendo tampão Tris–HCl 0,06 M pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 10% β-mercaptoetanol e 0,05% azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100 °C, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS e à coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.21 Detecção de anticorpo anti-P21 em soro por ELISA

A detecção de anticorpos anti-P21 foi feita em placas de 96 poços de alta afinidade, sensibilizadas com 5 µg/poço de rP21 em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M, pH 9,6) *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween e foi realizado o bloqueio dos poços com tampão PBS contendo 10% de soro fetal bovino por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e foram adicionados 50 µL de soro puro ou diluído 20 vezes. Foram utilizados soros humanos de controles positivos ou negativos de kits comerciais utilizados na rotina laboratorial para diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (Quadro 1) em triplicata por 1 hora a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados 5 vezes com PBS-Tween e incubados com 50 µL de anticorpos anti-IgG humano conjugado com horseradish peroxidase (HRP), por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween e foi adicionado o substrato tetramethylbenzidine (TMB) por 15 minutos em temperatura ambiente e

protegida da luz. Posteriormente, foi colocado 50 µL de ácido sulfúrico e a densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro GloMax® a 450nm.

Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / \text{Cut-off}$. O cut-off foi estabelecido como a média de DO de 3 controles negativos acrescida de 2 desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quando Índice ELISA > 1.

O trabalho não foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), pois utilizamos apenas amostras de kits comerciais para diagnóstico laboratorial.

Quadro 1. Controles oriundos de kits comerciais de diagnóstico laboratorial de infecção por *T. cruzi* e *Toxoplasma gondii*, utilizados para avaliação da detecção de anticorpos anti-P21 por meio de ELISA.

<i>Controle</i>	<i>Kit</i>	<i>Marca</i>	<i>Controles/ kits</i>
<i>A</i>	ELISA	Symbiosis	Positivo/ Chagas
<i>B</i>	Hemaglutinação	Wiener	Positivo/ Chagas
<i>C</i>	Imunofluorescência	Wana	Positivo/ Chagas
<i>D</i>	ELISA	Wiener	Positivo/ Chagas
<i>E</i>	ELISA	Symbiosis	Negativo/ Chagas
<i>F</i>	Hemaglutinação	Wiener	Negativo/ Chagas
<i>G</i>	Imunofluorescência	Wama	Positivo apenas para <i>Toxoplasma gondii</i>

4.22 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram verificados para distribuição normal. Diferenças significativas foram determinadas por meio dos testes *Mann-Whitney* e testes de múltiplas comparações: *Tukey's* (amostras paramétricas) ou *Dunn's* (amostras não paramétricas). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.01. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A ausência ou expressão reduzida de Gal-3 leva a altas taxas de multiplicação intracelular de *T. cruzi*

Com o intuito de analisar o efeito da redução e da ausência de expressão da proteína Gal-3 do hospedeiro durante a multiplicação intracelular de *T. cruzi*, utilizamos macrófagos imortalizados Gal-3 KD e macrófagos peritoneais Gal-3 KO e seus respectivos controles WT. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, infectadas por *T. cruzi* da cepa CL e foi contado o número de parasitos em 100 células infectadas e o número de parasitos extracelulares.

Neste experimento *in vitro*, observamos altas taxas de replicação parasitária nos tempos tardios de multiplicação em células com expressão de Gal-3 reduzida ou ausente, quando comparadas com os controles. Macrófagos imortalizados Gal-3 KD apresentaram taxas de replicação parasitária significativamente altas nos tempos de 72, 96 e 150 horas pós-infecção em relação a macrófagos imortalizados WT (Figura 3A). O mesmo foi encontrado em macrófagos peritoneais Gal-3 KO nos tempos de 96 e 150 horas (Figura 3B).

Nesse sentido, nota-se que a expressão de Gal-3 pode contribuir para impedir a multiplicação intracelular do parasito. Consequentemente, na sua ausência, as células hospedeiras seriam lisadas em maior grau. Para confirmar essa hipótese, quantificamos o número de parasitos liberados no sobrenadante de macrófagos peritoneais infectados e também a viabilidade celular por marcação com iodeto de propídio.

Nossos resultados mostraram uma maior porcentagem de células Gal-3 KO lisadas (Figura 3C), coincidindo com uma liberação aumentada de parasitos (Figura 3D). Assim, fornecemos *in vitro* a evidência que sustenta a noção de que a Gal-3 desempenha um papel crucial no controle da proliferação de *T. cruzi* e na limitação da lise de células do hospedeiro.

Corroborando com esses dados, nossos achados anteriores *in vivo* mostraram que camundongos Gal-3 KO apresentaram altas taxas de parasitemia quando comparados com camundongos WT. Após 30 dias de infecção, enquanto animais WT apresentaram parasitemia controlada, os animais Gal-3 KO ainda apresentaram altas taxas de parasitos

no sangue, indicando que a expressão de Gal-3 favorece o controle da carga parasitária de *T. cruzi* (DA SILVA *et al.*, 2017).

Estudos com *Toxoplasma gondii* também evidenciam que animais Gal-3 KO apresentam uma maior carga parasitária no cérebro e pulmões, menor infiltrado de neutrófilos e macrófagos na cavidade peritoneal e menor taxa de sobrevivência (BERNARDES *et al.*, 2006). Além disso, animais Gal-3 KO infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* também apresentaram uma maior suscetibilidade à infecção quando comparados com os animais WT (RUAS *et al.*, 2009).

Resultados semelhantes foram observados para galectina-1 (Gal-1), outro membro da família das galectinas, cuja expressão reduziu a infecção por *T. cruzi* (BENATAR *et al.*, 2015). De acordo com estes autores, camundongos deficientes em Gal-1 e infectados com *T. cruzi* apresentaram maior parasitemia e menor taxa de sobrevivência que camundongos WT. Dessa forma, estes dados reforçam a importância de algumas lectinas no controle da infecção por *T. cruzi*.

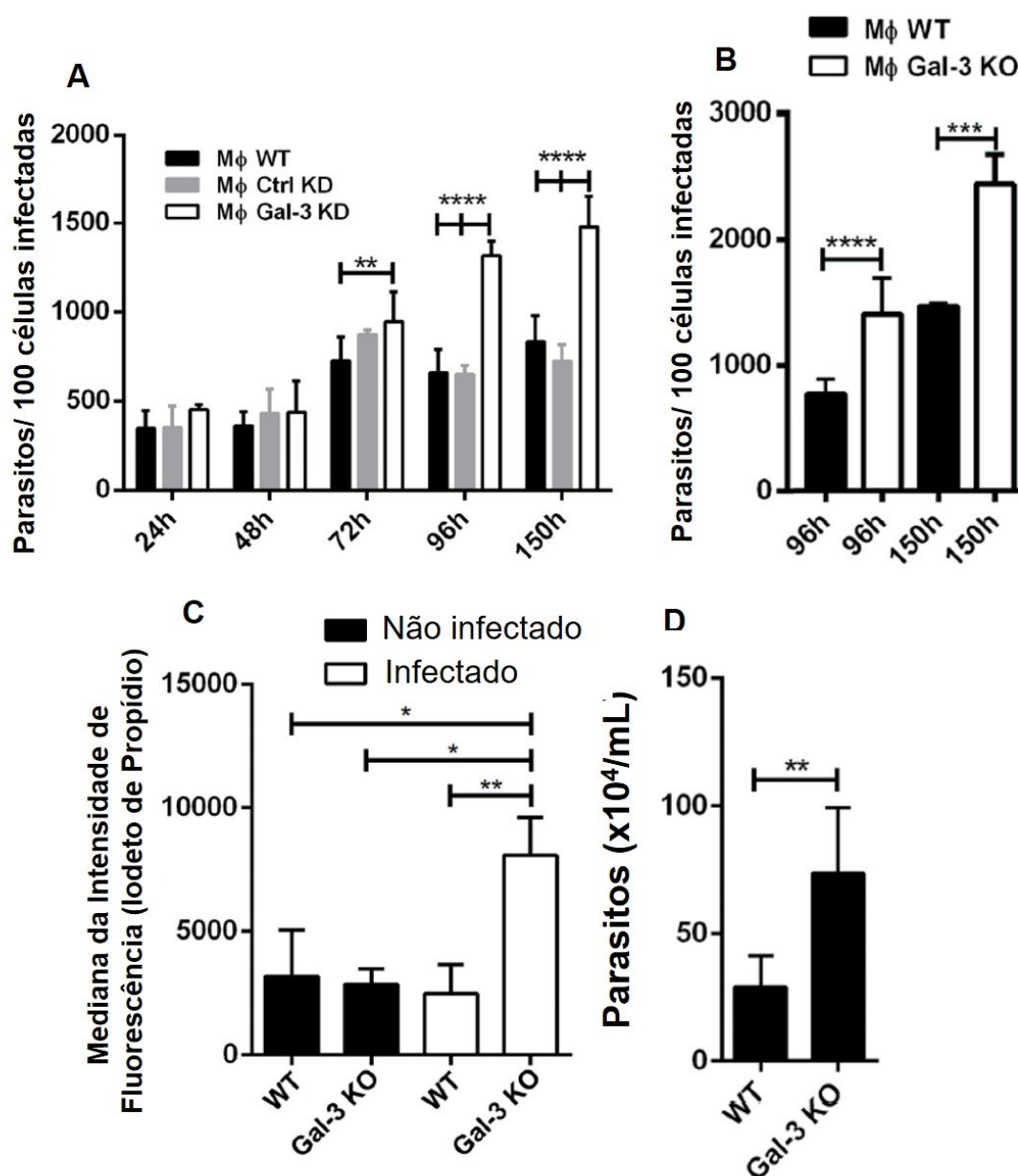


Figura 3. Ausência ou expressão reduzida de Gal-3 leva a altas taxas de replicação de *T. cruzi* e maior lise de células do hospedeiro. Macrófagos imortalizados e macrófagos peritoneais foram plaqueados e submetidos a invasão por *T. cruzi* da cepa CL. Nos diferentes tempos analisados, as lamínulas foram fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitos em 100 células infectadas foi contado em macrófagos imortalizados WT, Ctrl KD e Gal-3 KD nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 150 horas (A); e em macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO nos tempos de 96 e 150 horas (B). A porcentagem de células lisadas foi determinada pela incorporação nuclear de iodeto de propídio, analisada por meio de citômetro de fluxo e os resultados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF) (C). O número de parasitos liberados no sobrenadante de macrófagos peritoneais após 96 horas de infecção foi contado em câmara de Neubauer (D). As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal–Wallis e Dunn’s para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.2 Camundongos Gal-3 KO infectados por *T. cruzi* apresentaram níveis elevados de fibrose cardíaca

A fibrose é uma das alterações que ocorre de forma lenta e progressiva na Doença de Chagas. Em condições experimentais, observa-se fibrose no coração já nos primeiros dias de infecção e pode ser a causa da perda progressiva da atividade contrátil do miocárdio nos chagásicos crônicos. Geralmente, essa fibrose ocorre por substituição de miocélulas por áreas irregulares de neoformação colágena, e o conjunto de fibroses focais ao longo dos anos pode evoluir para um quadro grave (SWYNGHEDAUW, 2006).

A fim de obter informações adicionais sobre o papel da Gal-3 no dano cardíaco causado pela doença de Chagas, infectamos intraperitonealmente camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO com *T. cruzi* da cepa CL. Após 90 dias de infecção analisamos a presença de colágeno em tecido cardíaco por meio de cortes histológicos corados com Picrosirius e por PCR em tempo real.

Notamos maior nível de fibrose no coração de animais Gal-3 KO infectados (Figura 4A). As fibras de colágeno na fase crônica da infecção foram compostas principalmente de Colágeno tipo I (Figura 4B e D) e sem alteração no colágeno tipo III (Figura 4C e E).

Além disso, avaliamos a expressão gênica do fator de crescimento transformador- β (TGF- β). Vimos que na fase crônica há um aumento de TGF- β no coração de camundongos Gal-3 KO quando comparados ao grupo controle (Figura 4F). Na fibrose, o TGF- β contribui para a ativação de fibroblasto, estimulação da transição epitelial-mesenquimal, produção de fibras da matriz extracelular e modulação de metaloproteases de matriz (BUJAK e FRANGOIANNIS, 2007; WENDT *et al.*, 2009). Estudos mostraram que pacientes com doença de Chagas apresentam níveis mais elevados de TGF- β e que a inibição farmacológica da sinalização de TGF- β em modelos de doença de Chagas aguda diminuiu efetivamente a infecção e a extensão de fibrose miocárdica (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2002; WAGHABI *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Esta citocina está associada com o aumento da deposição de colágeno, dessa forma, acreditamos que a maior expressão de TGF- β em áreas próximas às lesões teciduais pode ter contribuído para maior deposição de componentes da matriz extracelular e fibrose em animais Gal-3 KO.

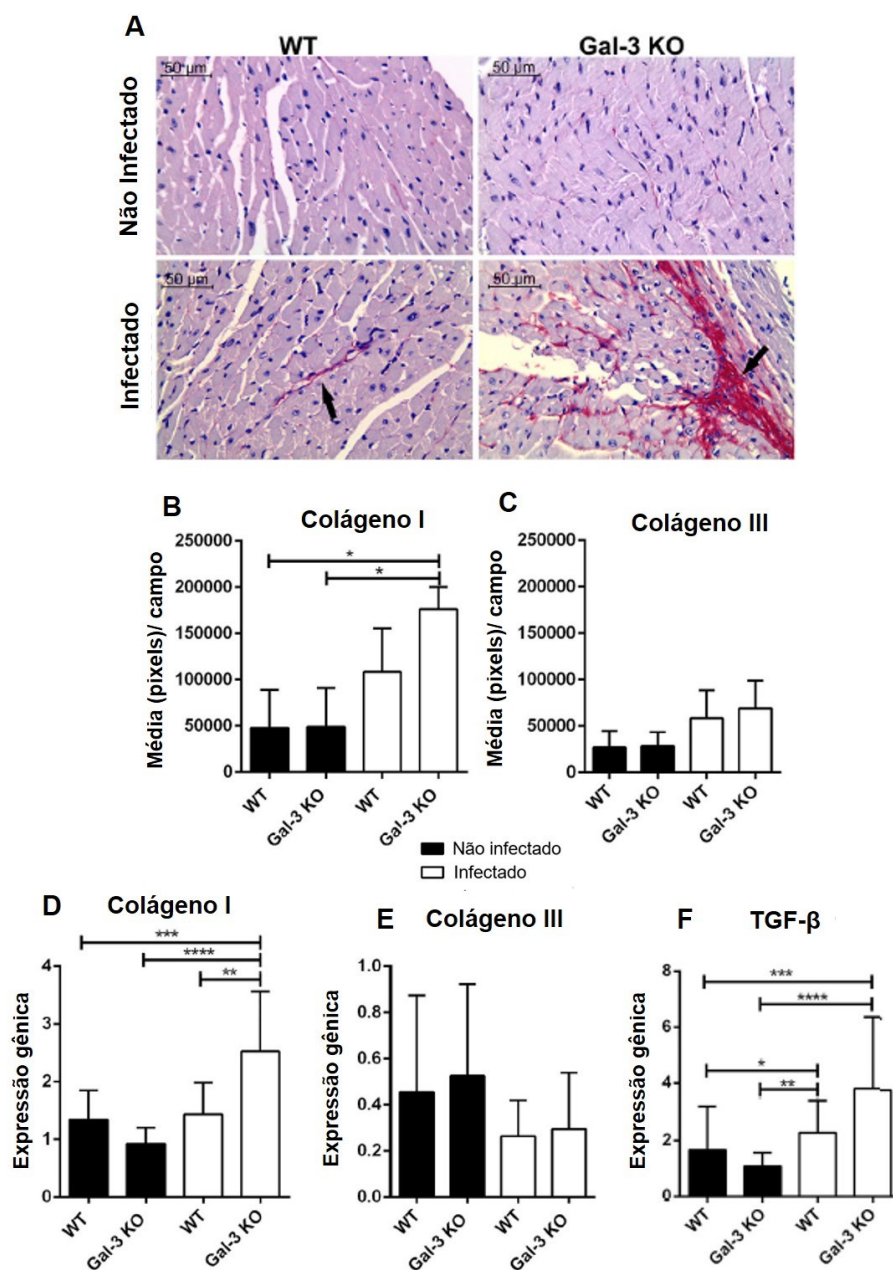


Figura 4. Ausência de Gal-3 leva a altos níveis de fibrose no coração durante a fase crônica de infecção por *T. cruzi*. Camundongos WT e Gal-3 KO foram infectados com *T. cruzi* da cepa CL durante 90 dias para análise de fibrose por técnicas histológicas e RT-PCR em tempo real. Cortes histológicos de tecido cardíaco foram corados com Picrosirius Red para quantificação de colágeno tipo I e III. Imagens histológicas representativas de coração de camundongos WT e Gal-3 KO infectados ou não por *T. cruzi* com marcação de colágeno total. Coloração em vermelho representa fibras de colágeno (setas pretas) (A). Os cortes histológicos corados foram analisados sob microscopia de luz polarizada com objetiva de 40X para diferenciação de colágeno tipo I (B) e colágeno tipo III (C). A expressão gênica de colágeno tipo I (D), colágeno tipo III (E), e TGF- β (F) foram quantificadas por meio de RT-PCR em tempo real. Camundongos Gal-3 KO infectados apresentaram altas taxas de colágeno tipo I no coração. A infecção não alterou os níveis de colágeno tipo III. A expressão gênica de TGF- β foi maior em camundongos Gal-3 KO. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal–Wallis e Dunn's para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

O aumento da fibrose também pode estar relacionado ao recrutamento de mastócitos. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa evidenciaram a presença de níveis elevados de mastócitos em tecido cardíaco de animais Gal-3 KO na fase crônica da infecção (DA SILVA *et al.*, 2017). Curiosamente, White *et al.* (2015), relatam que mastócitos liberam triptase e trombina que aumentam a diferenciação de fibrócitos humanos e iniciam a formação de fibras colágenas em tecidos com danos. Estudos relacionados com cardiopatia chagásica crônica verificaram que o aumento de mastócitos está relacionado topograficamente com a miocardite e pode ser um dos fatores agravantes da fibrose na doença de Chagas (ALMEIDA *et al.*, 1975; PINHEIRO *et al.*, 2003).

Embora o impacto de Gal-3 durante a infecção por *T. cruzi* ainda seja parcialmente desconhecido, nossos trabalhos anteriores revelaram que esta lectina promove o recrutamento de leucócitos, controle da parasitemia e resposta imunológica Th1/Th2 equilibrada. Esta lectina tem papel na polarização da resposta imune na fase aguda para o perfil Th1 com secreção de TNF- α , IFN- γ e diminuição de IL-4, levando ao controle da replicação do parasito e maior resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. Na fase crônica percebemos que em animais WT infectados houve uma resposta similar aos pacientes com a forma indeterminada da doença, direcionada para o perfil Th2 com níveis basais de IFN- γ e TNF- α , diminuição de IL-1 β e aumento de IL-4; enquanto em animais Gal-3 KO infectados não houve o aumento da citocina IL-4. A resposta observada nos animais que expressam Gal-3 pode ser considerada mais adequada no sentido de controlar o dano tecidual e diminuir o comprometimento funcional do órgão (DA SILVA *et al.*, 2017).

Nossa hipótese é que a maior replicação parasitária em animais Gal-3 KO pode levar ao aumento da liberação de parasitos a partir de células infectadas. Este grande número de parasitos liberados dará continuidade ao ciclo de vida com invasão, multiplicação e lise celular. A grande quantidade de células lisadas pode acarretar em uma resposta inflamatória intensa, levando a substituição de fibras musculares funcionais por fibras colágenas, caracterizando maior fibrose do órgão (Figura 5). Nesse sentido, os dados demonstraram o importante papel da Gal-3 no controle da carga parasitária e na limitação do dano tecidual (DA SILVA *et al.*, 2017).

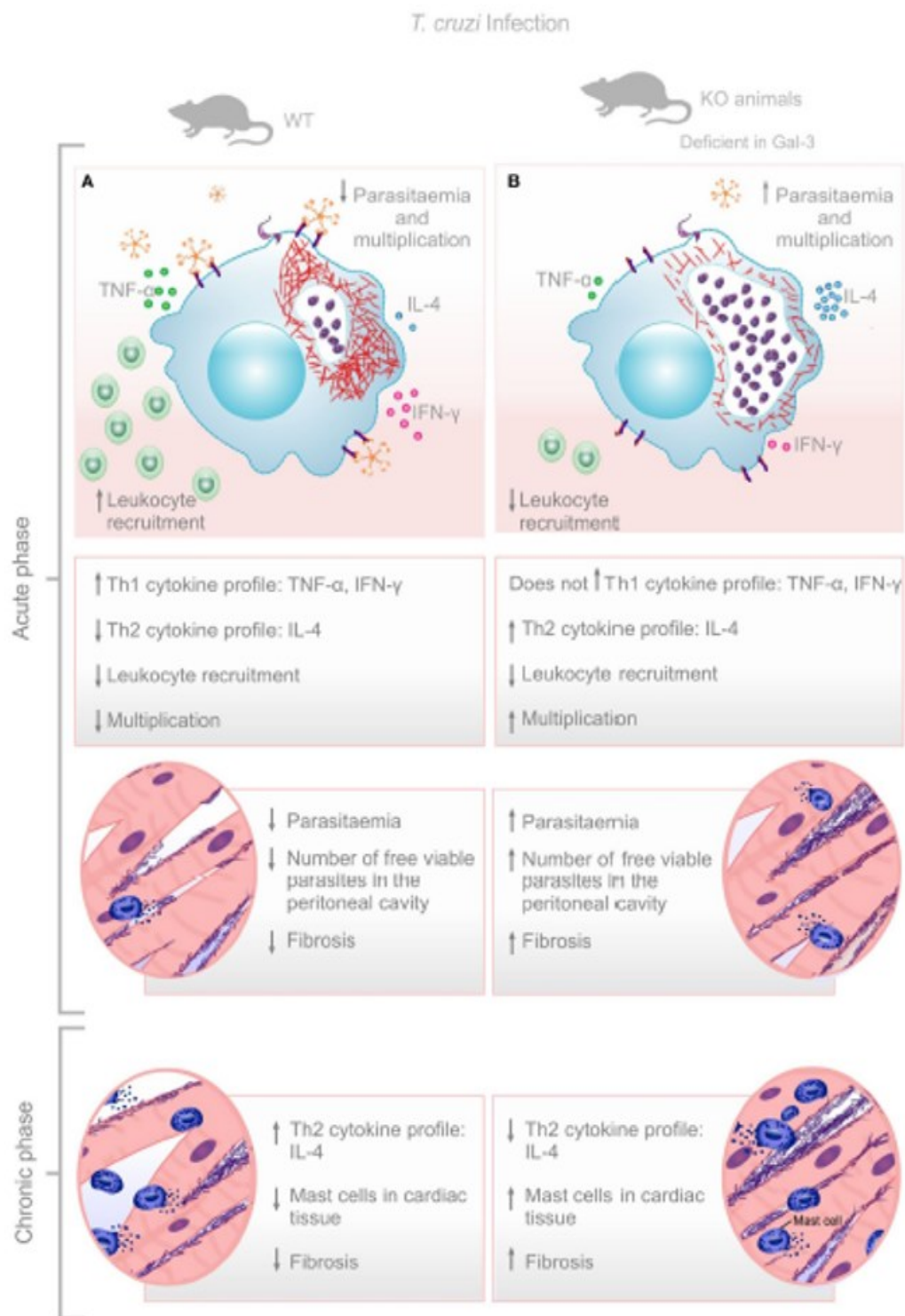


Figura 5. Participação da Gal-3 na infecção por *T. cruzi*. A expressão de Gal-3 garante o maior recrutamento de leucócitos, resposta imunológica Th1/Th2 equilibrada, menor parasitemia e menor fibrose cardíaca (A). A ausência de Gal-3 acarreta em menor recrutamento de leucócitos, resposta imunológica Th1/Th2 desequilibrada, maior parasitemia e maior fibrose cardíaca (B). Fonte: (DA SILVA *et al.*, 2017).

5.3 Tecido cardíaco de camundongos Gal-3 KO apresentaram menor expressão de CXCR4

CXCR4 é um receptor transmembrana acoplado à proteína G, cujo ligante natural é a quimiocina CXCL12, também conhecida como fator-1 derivado de célula estromal (SDF-1, Stromal Cell-Derived Factor 1) (BUSILLO e BENOVIC, 2007). A ligação do SDF-1 ao receptor CXCR4 leva a formação de um complexo entre o receptor e a subunidade G α i da proteína G, gerando inibição de adenilato ciclase mediada pela produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e mobilização de cálcio intracelular. A dissociação da subunidade G α i de G $\beta\gamma$ acarreta à ativação de múltiplos alvos downstream, como ERK1/2, MAPK, JNK, e efetores AKT (LU *et al.*, 2009; PRINCEN *et al.*, 2003; ROLAND *et al.*, 2003). Uma vez ativado o CXCR4 possui diversos papéis, como recrutamento de leucócitos, rearranjos do citoesqueleto e polimerização de actina e formação de pseudópodes (SUN *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, a avaliação da expressão de CXCR4 em diferentes subgrupos de leucócitos demonstrou que sua expressão foi menor em pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave. Além disso, foi observado uma correlação entre a diminuição da função cardíaca e a diminuição da expressão do receptor (TALVANI *et al.*, 2004).

Dessa forma, conhecendo as funções principais de CXCR4 e a correlação entre a diminuição de sua expressão gênica e o pior prognóstico para doença de Chagas, avaliamos os níveis de expressão gênica do receptor em coração de camundongos WT e Gal-3 KO não infectados. Utilizando metodologia de RT-PCR em tempo real percebemos que animais Gal-3 KO apresentaram expressão reduzida de CXCR4 quando comparados com animais WT (Figura 6). Sugerimos que essa expressão reduzida em camundongos Gal-3 KO pode ser uma das causas de menor recrutamento de leucócitos para o local de infecção, maior multiplicação intracelular, e maior parasitemia nesses animais.

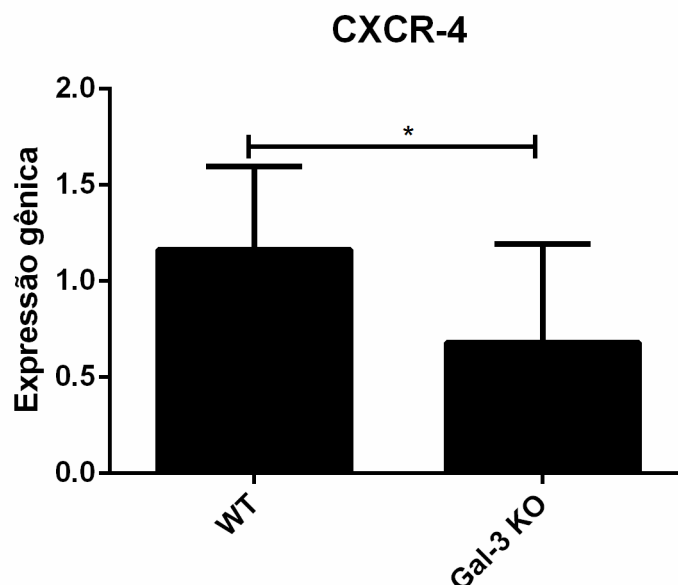


Figura 6. Camundongos Gal-3 KO apresentaram expressão reduzida de CXCR4. Coração de camundongos WT e Gal-3 KO foram utilizados para avaliar a expressão do receptor CXCR4 por meio de RT-PCR em tempo real. As diferenças estatísticas entre WT e Gal-3 KO foram determinadas por Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

5.4 rP21 apresentou atividade na polimerização de actina de forma menos expressiva em células Gal-3 KO

Actina é uma proteína que forma microfilamentos e consiste em um dos elementos fundamentais do citoesqueleto celular. A actina está presente na forma de monômero globular, chamado G-actina e na forma de um polímero filamentosos (F-actina) composto por uma cadeia linear de subunidades de G-actina. Artigos demonstram a relação entre a Gal-3 e a polimerização do citoesqueleto de actina. Foi visto que esta lectina promove remodelamento do citoesqueleto de forma dependente do aumento de expressão e fosforilação de outras proteínas como ezrina e fascina-1 e por ativação de Rac1 (MORE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; THOMAS e PASQUINI, 2019).

Estudos do nosso grupo de pesquisa envolvendo a rP21 demonstraram que esta proteína se liga ao receptor CXCR4, ativa a via de sinalização PI3K e, assim, exerce diversas funções, entre elas a indução de polimerização do citoesqueleto de actina (RODRIGUES *et al.*, 2012a, TEIXEIRA *et al.*, 2017). Conhecendo a importância do receptor CXCR4 na infecção por *T. cruzi*, avaliamos o impacto da expressão reduzida deste receptor nas células Gal-3 KO por meio de análise de suas funções após o tratamento com a proteína rP21.

Modificações no citoesqueleto de actina em células do hospedeiro infectadas por *T. cruzi* são observadas nos diferentes estágios do ciclo de vida do protozoário (LOW *et al.*, 1992). Durante a invasão, há um aumento da dinâmica de remodelamento do citoesqueleto. Uma vez que o parasito já se encontra no citoplasma da célula e começa a dividir, o citoesqueleto sofre alterações de maneira tempo-dependente, com a diminuição de actina filamentosa (MOTT *et al.*, 2009).

Sabendo da relevância do citoesqueleto na relação patógeno-hospedeiro, estudamos, por meio de marcação com faloidina em citômetro de fluxo, a polimerização de actina em células WT e em células Gal-3 KO infectadas por *T. cruzi* tratadas ou não com rP21. Durante a invasão (2 horas), a intensidade de fluorescência foi maior em todos os grupos quando comparados com os tempos de multiplicação. Neste mesmo tempo, a rP21 provocou polimerização de actina de forma mais expressiva em células WT (Figura 7A).

A presença de F-actina nos tempos de multiplicação, 48 horas (Figura 7B) e 96 horas (Figura 7C), foi maior em células WT. Após 48 horas de infecção, o tratamento com rP21 (40 µg/mL) promoveu aumento de actina filamentosa apenas no grupo WT (Figura 7B). Já em 96 horas, a rP21 exerceu seu papel na polimerização do citoesqueleto de actina também em células Gal-3 KO, mas esse efeito foi mais discreto quando comparado com células WT (Figura 7C).

A literatura relata que alguns patógenos possuem fatores de virulência que interferem no citoesqueleto de actina da célula hospedeira com a finalidade de induzir sua internalização e permanência (CASTELLANO *et al.*, 2001; NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). Assim, nossa hipótese é que a P21 seja um destes fatores, e notamos efeito reduzido em células que não expressam Gal-3, ou seja, de alguma forma a falta de Gal-3 compromete a atividade completa da rP21. Acreditamos que o citoesqueleto de actina pode funcionar como uma barreira física que dificulta a multiplicação de *T. cruzi*. Nesse contexto, o envolvimento da Gal-3 na polimerização do citoesqueleto de actina pode explicar os resultados anteriores em que células Gal-3 KO, com menores níveis de actina filamentosa, apresentaram maior multiplicação intracelular *in vitro*.

Uma das causas desse efeito pode ser o menor nível de expressão de CXCR4 em células Gal-3 KO, uma vez que a função de polimerização de actina pela rP21 é dependente deste receptor (RODRIGUES *et al.*, 2012a; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Uma

outra hipótese, que não exclui a primeira, seria a regulação exercida pela Gal-3 em proteínas envolvidas com a polimerização do citoesqueleto de actina. Foi visto esta atividade em uma proteína chamada fascina-1 (SEOK *et al.*, 2010). A fascina-1 se liga à actina, se localiza ao longo dos filopódios e induz protuberâncias da membrana, aumentando assim a motilidade da célula (KUREISHY *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2010). Esses trabalhos são evidências que a Gal-3 está relacionada ao citoesqueleto.

Dessa forma, a ausência da Gal-3 se mostra suficiente para propiciar um ambiente favorável à multiplicação intracelular. Após a fase aguda da doença de Chagas, fatores (citocinas, quimiocinas ou outras moléculas) liberados pelo hospedeiro induzem uma maior polimerização de actina na célula infectada para silenciar a infecção interferindo na replicação do parasito. Este resultado sugere a possibilidade da participação da Gal-3 na polimerização do citoesqueleto de actina durante a infecção por *T. cruzi* e controle da replicação do parasito e, por conseguinte, na propagação da doença.

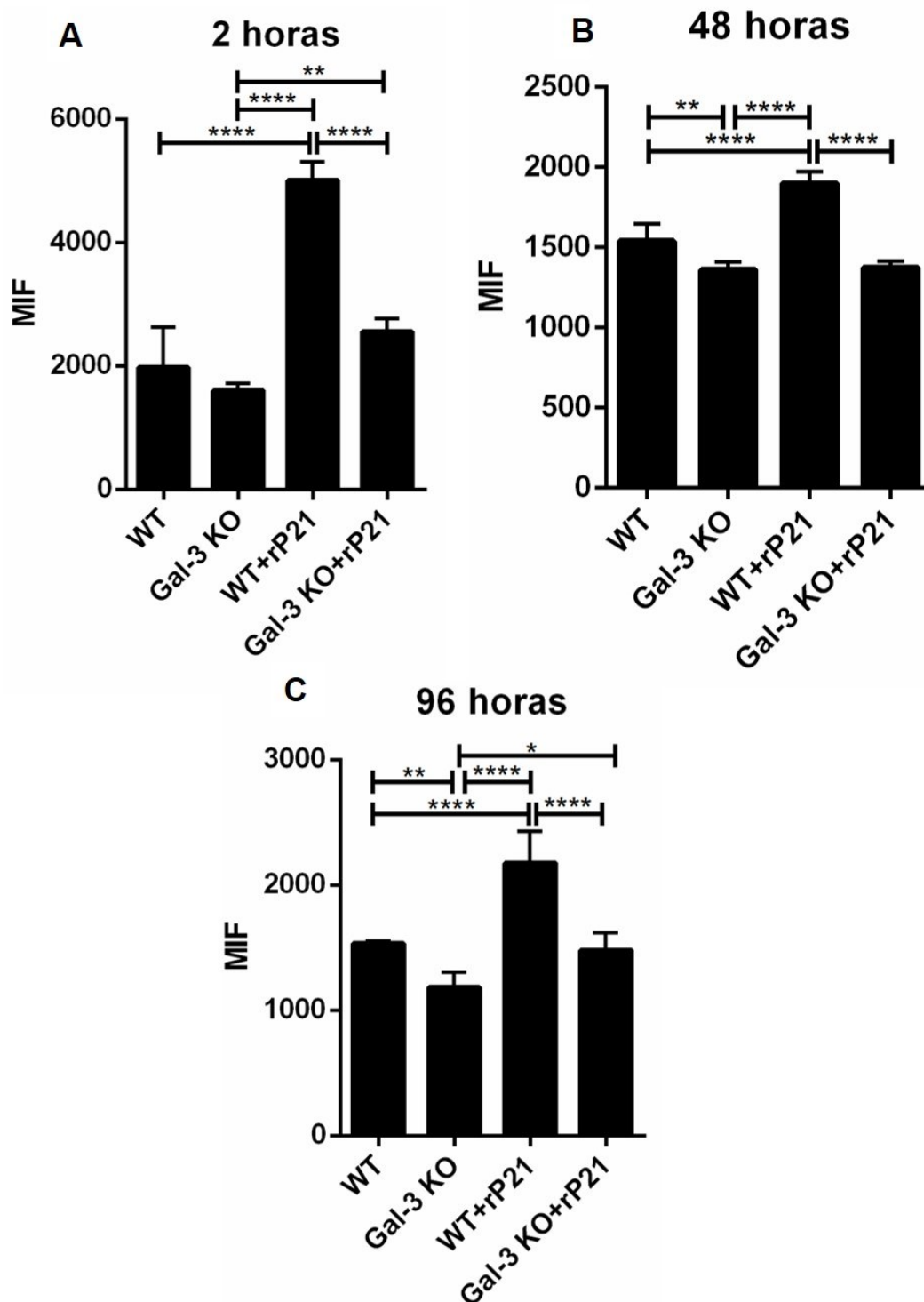


Figura 7. rP21 apresentou menor atividade na polimerização de actina em células Gal-3 KO. Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram infectados com a cepa G de *T. cruzi* e tratados ou não com rP21 (40 µg/mL) por 2 (A), 48 (B) e 96 horas (C). O citoesqueleto de actina foi marcado com Faloidina-TRITC e analisado em citômetro de fluxo. A rP21 exerceu seu papel na polimerização do citoesqueleto de actina de forma mais expressiva em células WT. As diferenças estatísticas foram determinadas por Tukey's para múltiplas comparações. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001.

5.5 rP21 exerceu atividade quimiotática de forma mais significativa em macrófagos peritoneais WT

O recrutamento de leucócitos é essencial para uma resposta imune efetiva e defesa do hospedeiro. A expressão diferencial de receptores que controlam o tráfego intracelular e o recrutamento de leucócitos pode resultar maior suscetibilidade a infecções. Muitos estudos têm atribuído um papel importante da sinalização CXCR4/CXCL12 na migração e recrutamento de células. Investigações com rP21 concluíram que a proteína pode se ligar ao CXCR4 e promover quimiotaxia (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Da Silva e colaboradores (2017) observaram que camundongos Gal-3 KO infectados por *T. cruzi* apresentaram menor recrutamento de leucócitos. Nesse sentido, no presente trabalho, estudamos a participação da Gal-3 nesta atividade biológica que pode estar relacionada com a ativação de CXCR4. Para isso, foi feito o ensaio de quimiotaxia *in vitro* por meio do sistema de *transwell* com poros de 8 µm, utilizando macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO. Vimos que no controle positivo (Meio DMEM + SFB) as células WT (Figura 8A) apresentaram maior migração quando comparadas com as células Gal-3 KO (Figura 8D e G). A adição de rP21 promoveu migração de células WT (Figura 8C) significativamente maior que o grupo WT controle positivo (Figura 8A) e todos os grupos Gal-3 KO (Figura 8D-F).

Assim, percebemos que a proteína recombinante apresentou efeito reduzido na atividade quimiotática em células Gal-3 KO, a níveis menores que o controle positivo (Figura 8D, F e G). Sustentando a hipótese de que células Gal-3 KO expressam menos CXCR4, dessa forma, as funções biológicas dependentes desse receptor são reduzidas podendo levar a um menor recrutamento celular, maior multiplicação intracelular de *T. cruzi* e maior fibrose.

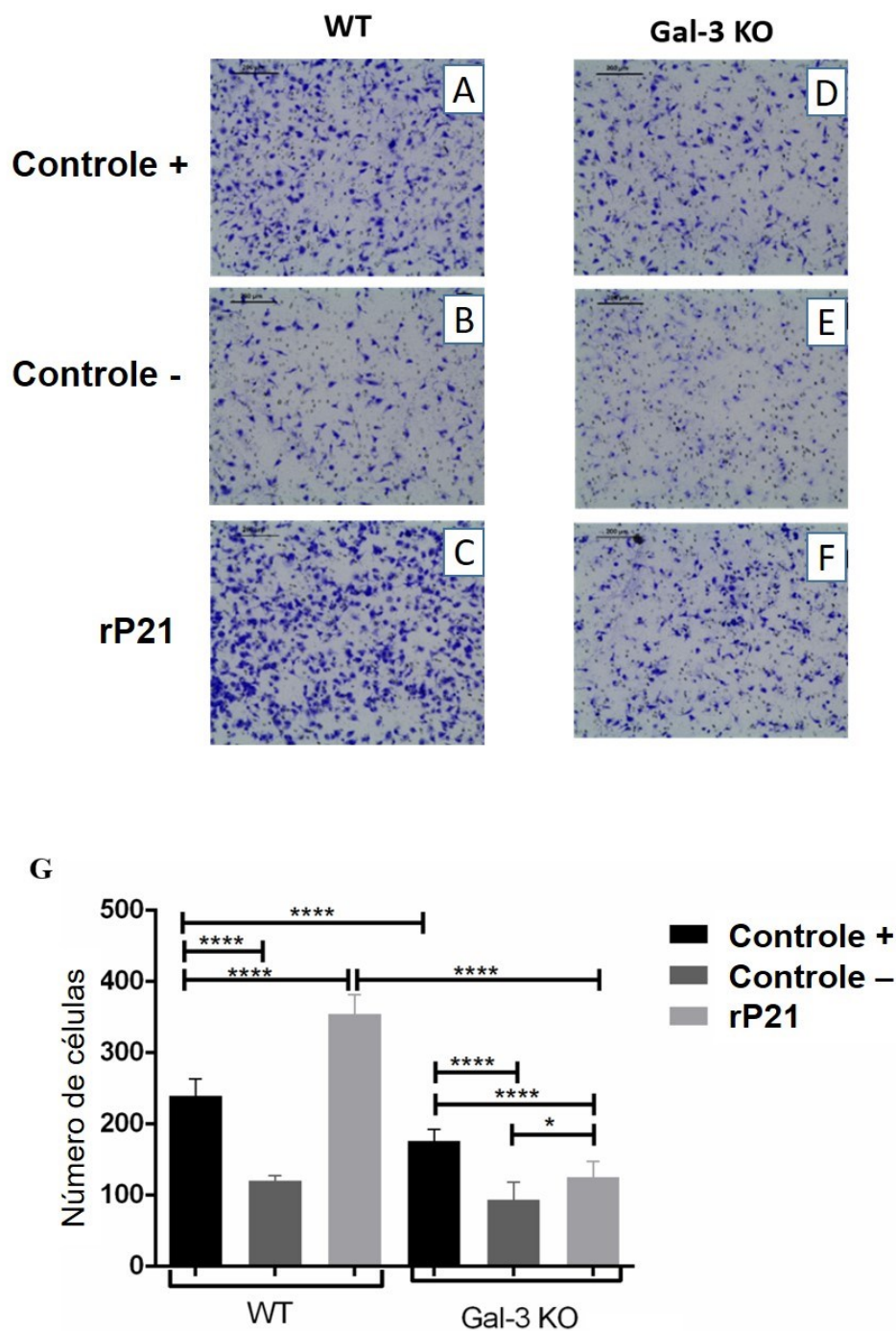


Figura 8. A atividade quimiotática foi maior em células WT tratadas com rP21. Ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizado por meio do sistema de *transwell* com poros de 8 μ m, utilizando macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO tratados ou não com rP21. Como controle positivo de migração foi utilizado DMEM +SFB (Controle +), como controle negativo foi utilizado DMEM sem SFB (Controle -). As células foram tratadas com rP21 (40 μ g/mL) em meio sem SFB. As diferenças estatísticas foram determinadas por Tukey's para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

5.6 Papéis da Gal-3 e rP21 na infecção experimental por *T. cruzi*

A Gal-3 tem ação em vários processos relacionados com a interação patógeno-hospedeiro nas fases aguda e crônica da doença de Chagas, que incluem desde mecanismos de infecção até a regulação do sistema imune. O presente estudo evidencia a importância da Gal-3 no controle da replicação parasitária e melhor desfecho da doença.

As proteínas Gal-3 e rP21 estão envolvidas no recrutamento de leucócitos, na polimerização do citoesqueleto de actina e no controle da multiplicação intracelular. Com o objetivo de avaliar se o tratamento com rP21 durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi* pode contribuir para controlar a replicação do parasito em células deficientes em Gal-3, infectamos células WT e Gal-3 KO com as cepas Y e G. A análise *in vitro* da multiplicação no tempo de 96 horas demonstra que macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO tratados com rP21 apresentaram menor multiplicação intracelular no tempo estudado, quando comparado com os grupos não tratados (Figura 9A e B). As células Gal-3 KO na presença ou não de tratamento em todos os eventos de multiplicação *in vitro* tiveram maior número de parasitos em relação aos respectivos controles WT.

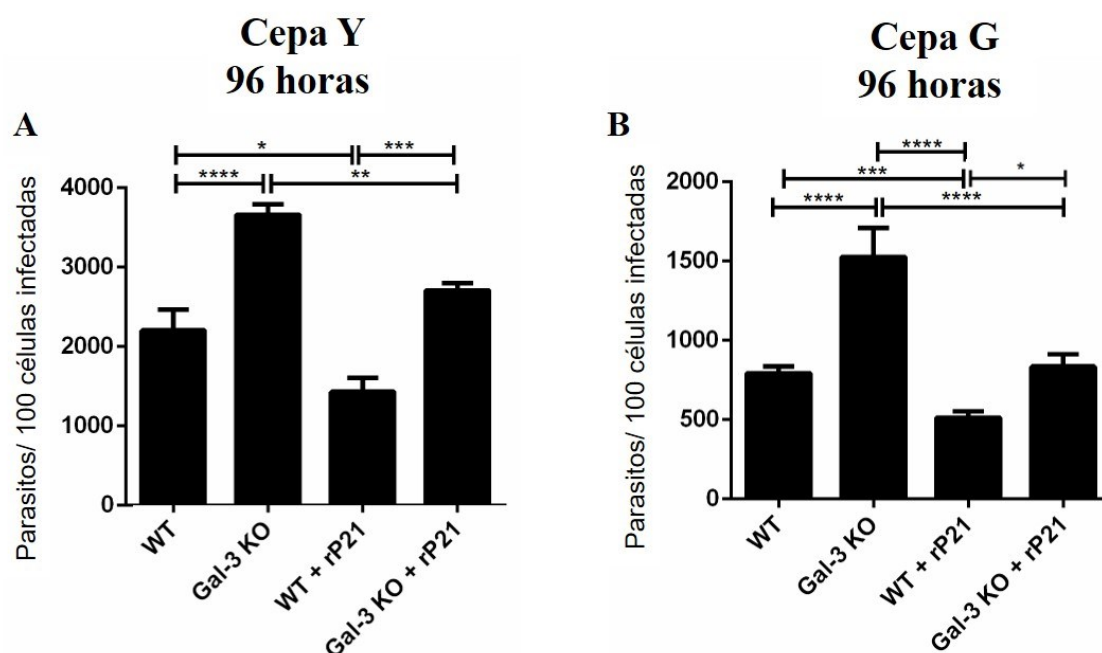


Figura 9. Tratamento com rP21 diminuiu a multiplicação intracelular em macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO. Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados e submetidos a invasão por *T. cruzi* das cepas Y (A) e G (B). Posteriormente, foi feito tratamento com 40 µg/mL de rP21 nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas. Após 96 horas, as lamínulas foram fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitos em 100 células infectadas foi contado. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal–Wallis e Dunn’s para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Sabendo que tanto a rP21 quanto a Gal-3 podem contribuir para impedir a intensa multiplicação intracelular do parasito, quantificamos a presença de parasitos extracelulares em células WT e Gal-3 KO, na presença ou não de rP21, em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para cumprir esse objetivo, primeiramente macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados e infectados com *T. cruzi* das cepas Y e G. Nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas as células foram tratadas com 40 µg/mL de rP21 e foi contado o número de parasitos extracelulares 48, 72 e 96 horas pós-infecção. O tratamento com rP21 reduziu o número de parasitos extracelulares do grupo Gal-3 KO em todos os tempos estudados (Figura 10A, B, C, E, F e G). Entretanto, mesmo com a adição de rP21, em células Gal-3 KO a quantidade de parasitos liberados no meio extracelular foi maior quando comparada com células WT nos tempos de 72 e 96 horas.

Posteriormente, para avaliação *in vivo*, infectamos intraperitonealmente camundongos WT e Gal-3 KO e tratamos os animais com rP21 nos tempos de 2, 24 e 48

horas pós- infecção. Após 96 horas, o número de parasitos livres na cavidade peritoneal foi contado e os resultados foram semelhantes aos observados *in vitro* (Figura 10D e H).

Durante o ciclo evolutivo há a multiplicação intracelular de parasitos, que rompem a célula, e dessa forma, há a liberação no interstício de restos de células hospedeiras e parasitos, induzindo uma resposta inflamatória. Essa resposta inflamatória inicialmente é focal e relacionada com o parasitismo, e de acordo com a evolução da infecção pode confluir e ocasionar inflamação com aspecto difuso (BRENER; GAZZINELLI, 1997; KIERSZENBAUM, 2005). Assim, em conjunto nossos dados evidenciam a importância das proteínas Gal-3 e P21 no processo de infecção. As duas proteínas estudadas se mostram importantes durante a fase de multiplicação parasitária e são capazes de diminuir o número de parasitos intracelulares e extracelulares. Acreditamos que quanto menor o número de parasitos liberados, menor será a quantidade de parasitos viáveis para infectar outras células e dar continuidade ao ciclo.

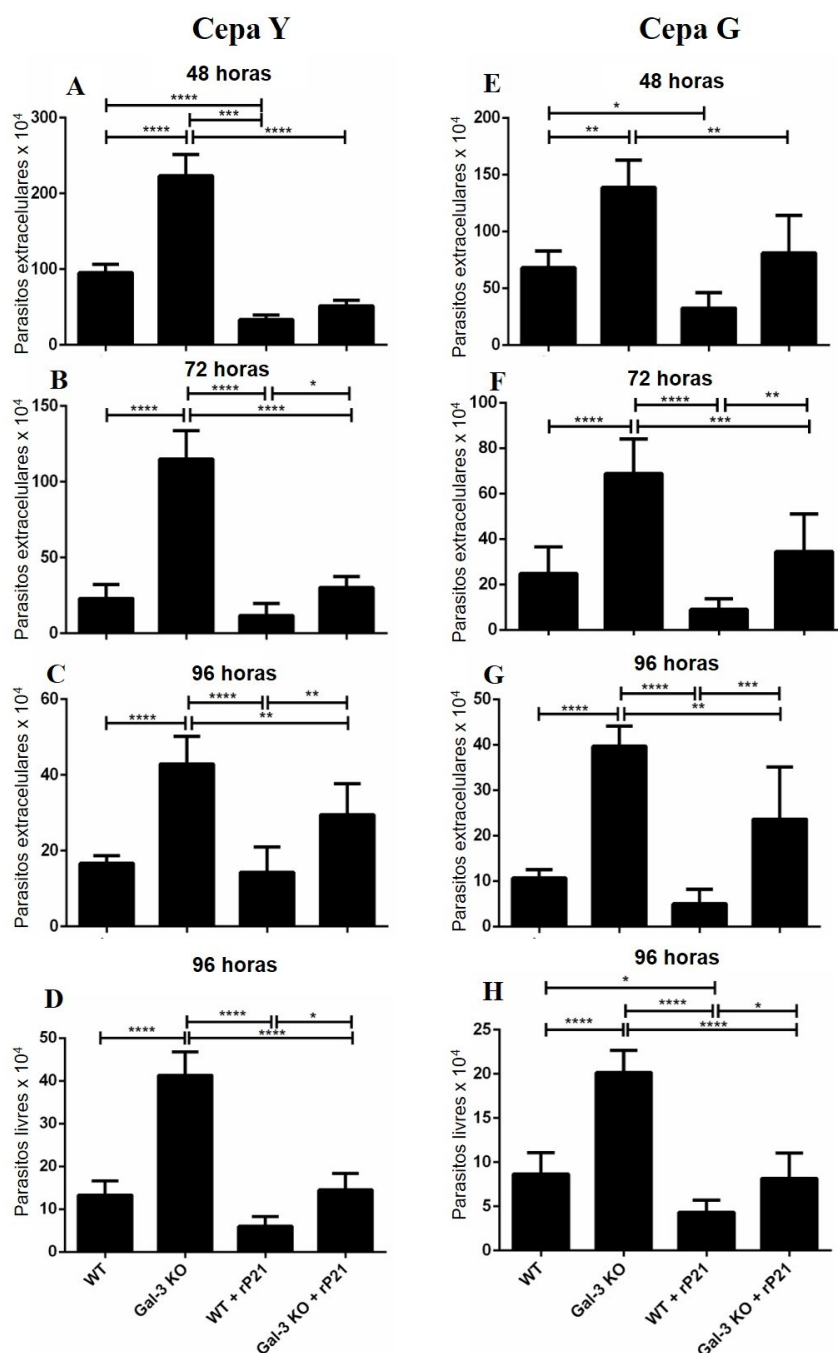


Figura 10 Tratamento com rP21 resultou em menores níveis de parasitos extracelulares *in vitro* e parasitos livres na cavidade peritoneal *in vivo*. Macrófagos peritoneais WT e Gal-3 KO foram plaqueados e submetidos a invasão por *T. cruzi* das cepas Y e G. Após 2, 24, 48 e 72 horas as células foram tratadas com 40 $\mu\text{g/mL}$ de rP21. O número de parasitos liberados no sobrenadante após 48, 72 e 96 horas de infecção foi contado (A, B, C, E, F, G). Para análise do efeito de rP21 *in vivo*, camundongos WT e Gal-3 KO foram infectados intraperitonealmente por *T. cruzi* das cepas Y e G, e tratados com 40 μg de rP21 após 2, 24, 48 e 72 horas de infecção. Após 96 horas, o número de parasitos livres na cavidade peritoneal foi contado (D e H). Comparações foram feitas utilizando por Kruskal–Wallis e Dunn’s para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Geralmente, a manifestação da forma grave das doenças parasitárias representa uma falta de coadaptação entre o hospedeiro e o parasito. A morte do hospedeiro pode reduzir as chances de os parasitos atingirem outros indivíduos. Dessa forma, espécies que causam menores danos ao hospedeiro podem ter melhores taxas de sobrevivência a longo prazo (SIMON, 1960; SMITH, 1934; SWELLENGREBEL, 1940). O processo de interação de *T. cruzi* e a célula envolve várias moléculas de ambas as partes. Essas moléculas contribuem para adesão, reconhecimento, invasão, multiplicação, reposta imune e progressão ou resolução da doença (YOSHIDA e CORTEZ, 2008).

A literatura retrata a ocorrência de um estágio de dormência metabólica em parasitos, como bactérias e protozoários. Tal evento pode surgir espontaneamente ou na presença de sinais de estresse resultantes do sistema imunológico e do uso de medicamentos (HARMS *et al.*, 2016; JARA *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018). Na doença de Chagas, o tratamento com Benznidazol e Nifurtimox faz com que ocorra a morte rápida da maioria dos parasitos, entretanto, há a persistência de parasitos intracelulares não replicativos mesmo com altas doses e longo tempo de exposição à droga. Isso ocorre por presença de amastigotas transitoriamente adormecidos que após períodos prolongados podem retomar a replicação. A transformação para o estágio quiescente ou para estágio replicativo pode ocorrer por estímulos de componentes citoplasmáticos do hospedeiro ou por moléculas do parasito que se acumulam no interior da célula (DIAS *et al.*, 2008; TARLETON, 2013; VIOTTI *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018).

Os dados apresentados demonstram a P21 como provável componente que contribui para a transformação do parasito para quiescência, e dessa maneira, facilita a perpetuação parasitária. A atividade quimiotática associada com a atividade pró-fagocítica da proteína, garante ao *T. cruzi* a permanência no interior da célula e evasão do sistema imune. No citoplasma, o parasito secreta P21 que induz a polimerização do citoesqueleto de actina e reduz a replicação parasitária. A Gal-3 do hospedeiro também apresenta papéis importantes no recrutamento de leucócitos, polimerização do citoesqueleto de actina e controle da multiplicação intracelular. Assim, esses dois componentes promovem uma interação patógeno-hospedeiro de forma menos prejudicial para ambos e podem contribuir para o desenvolvimento de uma doença crônica.

5.7 rP21 não promoveu formação de coágulo em plasma

Proteínas recombinantes são amplamente utilizadas para elucidar funções biológicas de proteínas em várias atividades celulares e podem ser aplicadas em diversas áreas, como na pesquisa básica e indústria farmacêutica. Aproximadamente 400 proteínas geradas a partir de tecnologia recombinante que envolve organismos vivos foram aprovadas para uso terapêutico. As proteínas terapêuticas podem apresentar atividade enzimática, imunoregulatória, podem ser utilizadas para diagnósticos ou como vacinas (RADER, 2008; ASSENBERG *et al.*, 2013).

Em trabalhos do nosso grupo de pesquisa, a rP21 mostrou ser uma ferramenta promissora para novos estudos de vacinação contra a doença de Chagas, pois foi capaz de induzir uma proteção significativa em camundongos imunizados com a proteína e posteriormente infectados por *T. cruzi*. A rP21 não apresentou efeitos colaterais, nem toxicidade a níveis sistêmicos (RODRIGUES, 2018). Além disso, experimentos comprovaram a manutenção da atividade fagocítica da rP21 mesmo após incubação por 24 horas desta proteína com soro de camundongos, demonstrando a estabilidade protéica frente a proteases presentes no soro (DE CASTILHOS, 2017).

Nossos resultados demonstraram importantes funções da rP21 no controle da multiplicação intracelular na fase aguda da infecção, atividade quimiotática e polimerização do citoesqueleto de actina. Assim, estudos com a proteína recombinante são importantes já que esta pode ser aplicada como forma terapêutica para promover uma maior resistência de hospedeiros mais suscetíveis a doença, como aqueles com níveis de Gal-3 reduzidos, e diminuir os danos causados pela persistência de *T. cruzi* nos tecidos.

Além disso, níveis elevados de marcadores moleculares envolvidos na ativação da cascata de coagulação são descritos em indivíduos infectados por *T. cruzi* mesmo em estágios iniciais da doença e podem ser considerados fatores de risco trombótico (ENGELMANN e MASSBERG, 2013; HERRERA *et al.*, 2011; HERRERA *et al.*, 2005). Sabendo que a P21 é constantemente secretada por *T. cruzi* e que a proteína recombinante pode constituir uma possível ferramenta terapêutica, experimentos com plasma e fibrinogênio foram feitos com o intuito de analisar se esta proteína está envolvida em processos de coagulação e eventos tromboembólicos.

O substrato foi colocado em cubetas e ao adicionar a amostra, o tempo de formação de coágulo foi aferido em um coagulômetro. Primeiramente, utilizamos como substrato plasma bovino citratado e adicionamos peçonha de *Bothrops moojeni* (controle positivo de coagulação) ou rP21 (40 ou 60 µg). Observamos que a rP21 não promoveu coagulação no plasma (Figura 11A).

Posteriormente, analisamos o efeito da rP21 no substrato de fibrinogênio, e verificamos que foi detectado formação de coágulo (Figura 11B). No fibrinogênio tratado com peçonha de *B. moojeni* houve formação de coágulo denso e firme, enquanto o tratado com rP21 houve apenas formação de pequenos aglomerados. A partir desse resultado testamos a atividade proteolítica da rP21 sobre o fibrinogênio, uma glicoproteína dimérica caracterizada por possuir 3 cadeias ($A\alpha$, $B\beta$ e γ). Para essa análise, o fibrinogênio e amostras (peçonha de *B. moojeni* ou rP21) foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes. Notamos que ao contrário do controle positivo, nos substratos tratados com rP21 não houve clivagem das cadeias do fibrinogênio (Figura 11C).

Observamos que a rP21 não possui atividade coagulante no plasma e não possui atividade fibrinogenolítica. Nossos resultados são corroborados por Teixeira *et al.*, (2017), onde demonstraram que a rP21 não apresentou atividade proteolítica sobre componentes da matriz extracelular (ECM), como matrigel e fibronectina. Acreditamos que a proteína recombinante possa promover a agregação de fibrinogênios apenas nesse substrato puro e não no plasma total. Assim, pesquisas utilizando a rP21 como tratamento da fase aguda ou profilaxia da doença de Chagas podem ser feitos pois a proteína não induz formação de coágulo no plasma e tem atividades relevantes para o controle da doença.

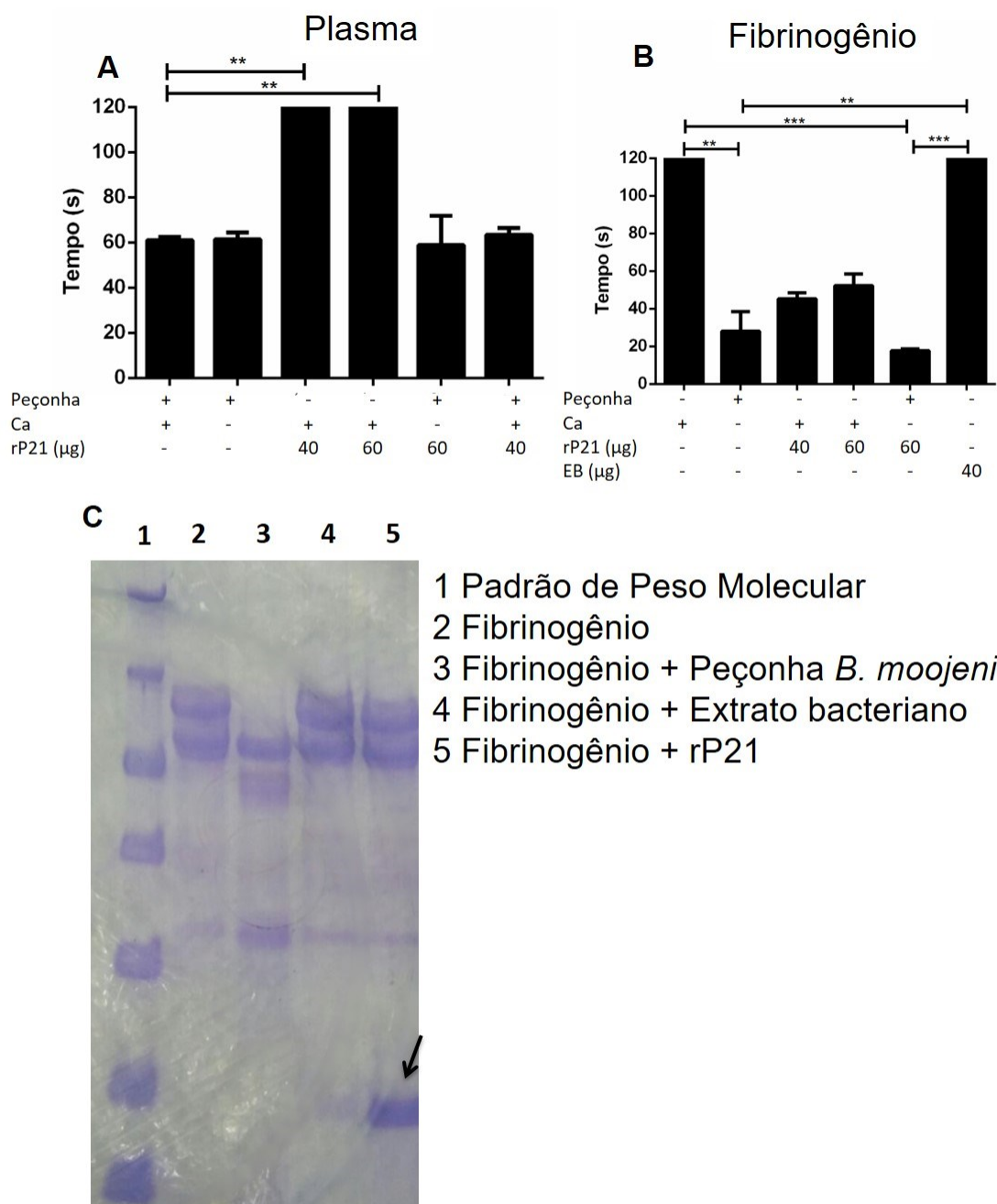


Figura 11. Não foi detectado formação de coágulo no plasma após tratamento com rP21. A atividade coagulante foi testada em plasma bovino citratado (A) e fibrinogênio (B) utilizando coagulômetro, e os resultados foram expressos em segundos (s). Os substratos foram tratados com peçonha de *Bothrops moojeni* (controle positivo de coagulação), rP21 (40 e 60 μg) e Extrato bacteriano (EB- controle de proteína recombinante). A detecção de coágulo foi vista apenas em fibrinogênio puro. Para análise da atividade fibrinogenolítica, o fibrinogênio e amostras (10 μg de peçonha de *Bothrops moojeni* ou 20 μg de rP21) foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% (C). A rP21 não promoveu coagulação em plasma, e não foi capaz de clivar as cadeias de fibrinogênio. A seta indica banda da rP21. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal–Wallis e Dunn’s para múltiplas comparações. **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

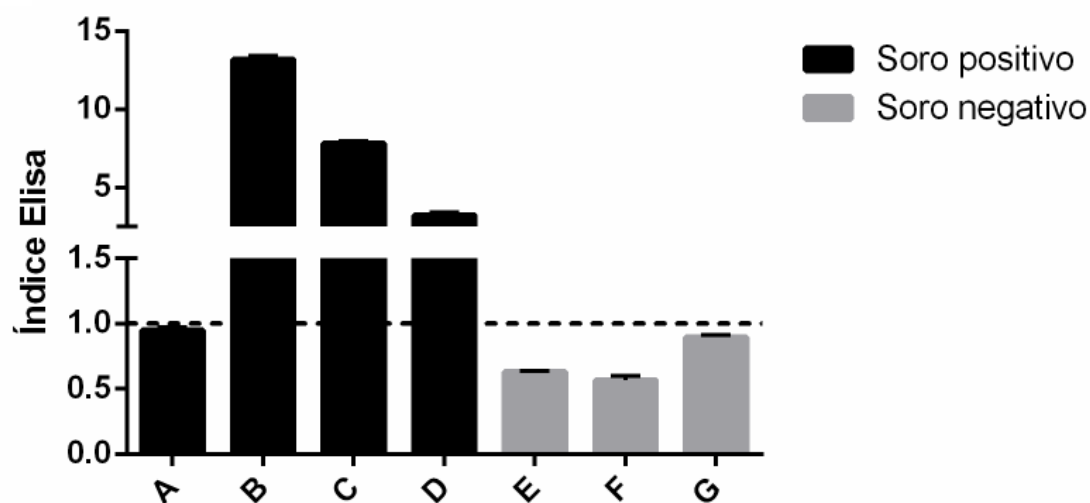
5.8 Detecção de anticorpos anti-P21 em soros controles de indivíduos infectados por *T. cruzi*

Com o intuito de verificar se o hospedeiro infectado por *T. cruzi* desencadeia uma resposta imune específica contra a proteína P21 secretada por todas as formas evolutivas do parasito, e se essa proteína pode ser um alvo promissor para futuros estudos relacionados com o diagnóstico da doença de Chagas realizamos a técnica de imunoenensaio.

A detecção de anticorpo anti-P21 foi feita por ELISA utilizando P21 recombinante e soros de controles positivos ou negativos de kits comerciais utilizados na rotina laboratorial para diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. O índice ELISA foi calculado e todos os soros negativos apresentaram $IE < 1$. Entre os controles positivos, o controle A apresentou-se na zona indeterminada e os outros controles positivos tiveram $IE > 1$ (Figura 12A e B). Houve detecção de anticorpo anti-P21 em controles positivos de amostras puras (Figura 12A) e amostras diluídas 20 vezes (Figura 12B).

Observamos que a produção de anticorpos anti-P21 não ficou restrita a condições experimentais de infecção. Soro de pessoas infectadas naturalmente também podem apresentar anticorpos específicos contra a P21. Não foi observada reatividade cruzada em soro de indivíduos infectados por *Toxoplasma gondii*. Dessa forma, pesquisas relacionando a proteína em estudo e técnicas de diagnóstico da doença de Chagas são relevantes, uma vez que a P21 está presente nas diferentes cepas e formas de *T. cruzi*, é exclusiva deste parasito e pode constituir uma forma mais específica para diagnóstico ou prognóstico.

A Detecção de Anti-P21 em soro puro



B Detecção de Anti-P21 em soro diluído (20x)

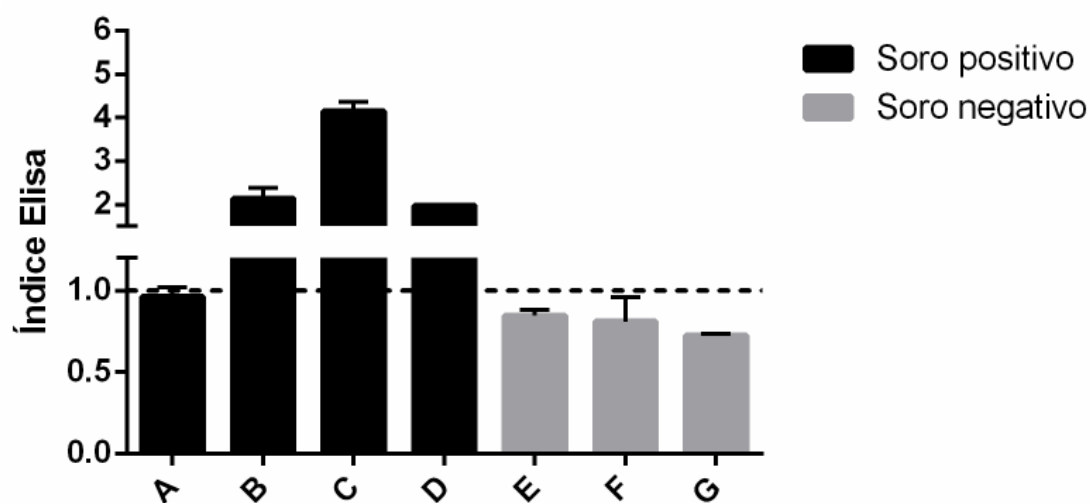


Figura 12. Anticorpos anti-P21 podem ser detectados em soros positivos para infecção por *T. cruzi*. A detecção de anticorpos anti-P21 foi feita por ELISA usando soro humano puro (A) e soro diluído 20 vezes (B) de controles positivos e negativos de kits comerciais utilizados para diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. A densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como Índice Elisa (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / \text{cut-off}$. Amostras foram consideradas positivas quando $IE > 1$.

A pesquisa de anticorpos específicos contra proteínas de *T. cruzi* é a base para desenvolvimento de melhores diagnósticos imunológicos da doença de Chagas (BRENIERE *et al.*, 1985; CARLIER *et al.*, 1985; BRENER e KRETTLI, 1990; TANOWITZ *et al.*, 1992). Na infecção experimental, a resposta específica é poliisotípica e constituída principalmente por anticorpos IgG2a, IgG2b e IgM (SPINELLA *et al.*, 1992; EL BOUHDIDI *et al.*, 1994).

Em modelos murinos foi visto o papel protetor de anticorpos que participam da eliminação de parasitos circulantes e que aparecem a partir da terceira semana de infecção (KIPNIS *et al.*, 1981; UMEKITA *et al.*, 1988). Diferentes mecanismos dependentes de anticorpos podem contribuir para eliminação de parasitos extracelulares, a literatura aborda que a pré-incubação de tripomastigotas com soro de indivíduo da fase crônica da doença diminui sua infectividade (McHARDY, 1977); a transmissão passiva de soros imunes ou de imunoglobulinas purificadas de animais na fase crônica protegem os camundongos contra uma infecção letal (SCOTT e GOSS-SAMPSON, 1984; BRENER 1986); e a depleção de linfócitos B torna os animais mais susceptíveis à infecção (OKABE *et al.*, 1980). Além disso, camundongos geneticamente modificados e maus produtores de anticorpos apresentam maior parasitemia e mortalidade (KIERSZENBAUM e HOWARD, 1976; BRENER e KRETTLI, 1990).

6. CONCLUSÃO

Demonstramos que tanto a proteína do hospedeiro Gal-3 quanto a proteína P21 de *T. cruzi* desempenham papéis essenciais na infecção. A Gal-3 possui atividade importante no recrutamento de leucócitos, na polimerização do citoesqueleto de actina e expressão de CXCR4, garantindo, dessa forma, menores níveis de parasitos intra e extracelulares, menor lise de células e taxas reduzidas de fibrose. A rP21 também mostrou efeitos importantes no aumento de F-actina, quimiotaxia, controle da replicação parasitária e diminuição de parasitos extracelulares. Além disso, a proteína recombinante pode ser considerada uma importante ferramenta terapêutica e profilática para a doença de Chagas, uma vez que pode induzir a produção de anticorpos específicos anti-P21 e controlar a multiplicação parasitária, sem induzir formação de coágulo em plasma.

Assim, observamos que esses dois componentes promovem uma interação patógeno-hospedeiro de forma menos prejudicial para ambos e podem contribuir para o desenvolvimento de uma doença crônica com baixa replicação intracelular.

7. ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

***Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy**

Received: 26 November 2014

Accepted: 21 October 2015

Published: 17 November 2015

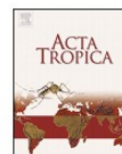
Thaise Lara Teixeira^{1,*}, Fabrício Castro Machado^{1,2,*}, Aline Alves da Silva^{1,*}, Samuel Cota Teixeira^{1,*}, Bruna Cristina Borges¹, Marlus Alves dos Santos¹, Flávia Alves Martins¹, Paula Cristina Brígido¹, Adele Aud Rodrigues¹, Ana Flávia Oliveira Notário¹, Bruno Antônio Ferreira¹, João Paulo Silva Servato¹, Simone Ramos Deconte¹, Daiana Silva Lopes³, Veridiana Melo Rodrigues Ávila³, Fernanda de Assis Araújo¹, Tatiana Carla Tomiosso¹, Marcelo José Barbosa Silva¹ & Claudio Vieira da Silva¹

Acta Tropica 157 (2016) 42–53



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica
A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection


Adele A. Rodrigues^a, Ana Flávia O. Notário^a, Thaise L. Teixeira^a, Rebecca T.e Silva^a, Amanda P.N. Quintal^a, Rosiane N. Alves^a, Paula C. Brígido^a, Carla S. Siqueira^b, Flávia A. Martins^a, Fabrício C. Machado^{a,c}, Tatiana M. Clemente^{a,c}, Aline A. da Silva^a, Bruna C. Borges^a, Samuel C. Teixeira^a, Marlus A. dos Santos^a, Claudio V. da Silva^{a,*}

^a Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^b Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, Brazil



AFAP-1L1-mediated actin filaments crosslinks hinder *Trypanosoma cruzi* cell invasion and intracellular multiplication



Karine Canuto Loureiro de Araújo¹, Thaise Lara Teixeira, Fabrício Castro Machado, Aline Alves da Silva, Amanda Pifano Neto Quintal, Claudio Vieira da Silva*

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Brazil

frontiers
in Cellular and Infection Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 03 November 2017
doi: 10.3389/fcimb.2017.00463



Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection

Aline A. da Silva^{1*}, Thaise L. Teixeira¹, Samuel C. Teixeira¹, Fabrício C. Machado^{1,2}, Marlus A. dos Santos¹, Tatiana C. Tomlosso¹, Paula C. B. Tavares¹, Rebecca T. e Silva Brígido¹, Flávia Alves Martins¹, Nadjania S. de Lira Silva^{1,2}, Cassiano C. Rodrigues¹, Maria C. Roque-Barreira³, Renato A. Mortara², Daiana S. Lopes⁴, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila⁴ and Claudio V. da Silva^{1*}

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil,

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil,

⁴ Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy

Received: 29 July 2016
Accepted: 17 February 2017
Published: 21 March 2017

Samuel Cota Teixeira¹, Daiana Silva Lopes², Sarah Natalie Cirilo Gimenes², Thaise Lara Teixeira¹, Marcelo Santos da Silva³, Rebecca Tavares e Silva Brígido⁴, Felipe Andrés Cordero da Luz⁵, Aline Alves da Silva¹, Maxwell Almeida Silva², Pilar Veras Florentino⁶, Paula Cristina Brígido Tavares¹, Marlus Alves dos Santos¹, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila², Marcelo José Barbosa Silva⁵, Maria Carolina Elias³, Renato Arruda Mortara⁶ & Claudio Vieira da Silva¹

Inflammation (© 2019)
DOI: 10.1007/s10753-019-00997-0



ORIGINAL ARTICLE

The Deleterious Impact of Interleukin 9 to Hepatorenal Physiology

Nadjanja Saraiva de Lira Silva,^{1,2} Bruna Cristina Borges,² Aline Alves da Silva,² Patrícia de Castilhos,² Thaise Lara Teixeira,² Samuel Cota Teixeira,² Marlus Alves dos Santos,² João Paulo Silva Servato,³ Allisson Benatti Justino,⁴ Douglas Carvalho Caixeta,⁴ Tatiana Carla Tomiosso,² Foued Salmen Espindola,⁴ and Claudio Vieira da Silva^{1,2,5}

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4^a ed. 4 Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, p. 99–107, 2001. DOI: 10.1006/jaut.2001.0523

ABEL, L.C.; FERREIRA, L.R.; CUNHA NAVARRO, I.; BARON, M.A.; KALIL, J.; GAZZINELLI, R.T.; RIZZO, L.V.; CUNHA-NETO, E. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN- γ and CD40-CD40L interactions. **Mediators Inflammation**, v. 2014, p. 345659, 2014. DOI: 10.1155/2014/345659

AGUSTÍ, R.; GIORGI, M.E.; DE LEDERKREMER, R.M. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* efficiently transfers α -(2 \rightarrow 3)-linked Nglycolylneuraminic acid to terminal beta-galactosyl units. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2465-2469, 2007. DOI: 10.1016/j.carres.2007.07.018

ALMEIDA, S.C.; PEREIRA, F.E.L.; TAFURI, W.L. Estudo quantitativo dos mastócitos na cardiopatia chagásica crônica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 17, p. 5-9, 1975. DOI: 10.1590/S0037-86821992000100007

ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M.; WEATHERLY, D.B.; ALBAREDA, M.C.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; OLIVERA, C.; ARMENTI, A.H.; TARLETON, R.L.; LAUCELLA, S.A. HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8⁺ T cells in chronic Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e288, 2008. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000288

ALVES, M.J.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V.Y.; COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 21, p. 75-82, 1986.

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 819–823, 2005. DOI: 10.1038/nrmicro1249

ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.71-80, 1999.

ANDREOLLO, N.A.; MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 22, 2009. DOI: 10.1590/S0102-67202009000400001

- ANDREWS, N.W.; ABRAMS, C.K.; SLATIN, S.L.; GRIFFITHS, G. A *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, p. 1277- 1287, 1990.
- ANDREWS, N.W.; HONG, K.S.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, p. 474–484, 1987.
- ANGHEBEN, A.; BOIX, L.; BUONFRATE, D.; GOBBI, F.; BISOFFI, Z.; PUPELLA, S.; GANDINI, G.; APRILI, G. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, p. 540-550, 2015. DOI: 10.2450/2015.0040-15
- ARAÚJO, K.C.L.; TEIXEIRA, T.L.; MACHADO, F.C.; DA SILVA, A.A.; QUINTAL, A.P.N.; DA SILVA, C. V. AFAP-1L1-mediated actin filaments crosslinks hinder *Trypanosoma cruzi* cell invasion and intracellular multiplication. **Acta Tropica**, v. 162, p. 167–170, 2016. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.06.028
- ARAÚJO-JORGE, T.C.; WAGHABI, M.C.; HASSLOCHER-MORENO, A.M.; XAVIER, S.S.; HIGUCHI, M.; KERAMIDAS, M.; BAILLY, S.; FEIGE, J.J. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1823-1828, 2002. DOI: 10.1086/345882
- ARAYA, J.E.; CANO, M.I.; YOSHIDA, N.; DA SILVEIRA, J.F. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, p. 161-169, 1994.
- ASSENBERG, R.; WAN, P.T.; GEISSE, S.; MAYR, L.M. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, p. 393–402, 2013. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.03.008
- AYO, C.M.; DALALIO, M.M.; VISENTAINER, J.E.; REIS, P.G.; SIPPET, E.Â.; JARDULI, L.R.; ALVES, H.V.; SELL, A.M. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. **Biomed Research International**, v. 2013, p. e284729, 2013. DOI: 10.1155/2013/284729
- BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N.W.; CUMMINGS, R.D.; DRICKA-MER, K.; FEIZI, T.; GITT, M.A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, R.C.; KASAI, K.; LEFFLER, H.; LIU, E.T; LOTAN, R.; MERCURIO, A.M.; MONSIGNY, M.; PILLAI, S.; POIRIER, F.; RAZ, A.; RIGBY, P.; RINI, J.M.; WANG, J.L. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v.76, p.597-598, 1994.
- BARRETO, M.P. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. **Guanabara Koogan**, p. 89-151, 1979.
- BARRIAS, E.S.; REIGNAULT, L.C.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. *Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into

mammalian host cell. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1340–1351, 2012. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.08.003

BARROS, M.L.; RIBEIRO, A.L.; NUNES, M.C.; ROCHA, M.O.C. Association between left ventricular wall motion abnormalities and ventricular arrhythmia in the indeterminate form of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 213-216, 2011. DOI: 10.1590/S0037-86822011005000020

BELMONT, T.F.M.; DO Ó, K.P.; DA SILVA, A.S.; VILAR, K.M.; MEDEIROS, F.S.; VASCONCELOS, L.R.S.; DOS ANJOS, A.C.M.; HATZLHOFFER, B.L.D.; PITTA, M.G.R.; BEZERRA, M.A.C.; ARAÚJO, A.S.; REGO, M.J.B.M.; MOURA, P.; CAVALCANTI, M.S.M. Single Nucleotide Polymorphisms at +191 and +292 of Galectin-3 Gene (LGALS3) Related to Lower GAL-3 Serum Levels Are Associated with Frequent Respiratory Tract Infection and Vaso-Occlusive Crisis in Children with Sickle Cell Anemia. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0162297, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0162297

BENATAR, A. F., GARCÍA, G. A., BUA, J., CERLIANI, J. P., POSTAN, M., TASSO, L.M.; SCAGLIONE, J.; STUPIRSKI, J.C.; TOSCANO, M.A.; RABINOVICH, G.A.; GÓMEZ, K.A. Galectin-1 prevents infection and damage induced by *Trypanosoma cruzi* on cardiac cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0004148, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004148

BERASAIN, P.; CARMONA, C.; FRANGIONE, B.; CAZZULO, J.J.; GONI, F. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, p. 23-29, 2003.

BERNARDES, E.S.; SILVA, N.M.; RUAS, L.P.; MINEO, J.R.; LOYOLA, A.M.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **The American Journal of Pathology**, v. 168, p. 1910-1920, 2006. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050636

BERRA, H.H.; PIAGGIO, E.; REVELLI, S.S.; LUQUITA, A. Blood viscosity changes in experimentally *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 32, p. 175–182, 2005.

BESTETTI, R.B.; RESTINI, C.B. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v.176, p. 309-314, 2014. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.07.112

BORGES, B.C. **Caracterização das atividades biológicas da proteína recombinante P21 de *Trypanosoma cruzi* sobre linhagem celular tumoral de mama *in vitro*.** Orientador: Claudio Vieira da Silva. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2015.

BRADFORD, M.M. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro de Doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, p. 1-29, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL, P.E.; DE CASTRO, L.; HASSLOCHER-MORENO, A.M.; SANGENIS, L.H.; BRAGA, J.U. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v.10, p.337, 2010.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review Microbiology**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease. **Parasitology Today**, v. 2, p. 196-199, 1986.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives Allergy Immunology**, v.114, p. 103-110, 1997.

BRENER, Z.; KRETTLI, A.U. Immunology of Chagas' disease. **Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects**, p. 247-261, 1990.

BRENIERE, S. F.; CARRASCO, R.; MIGUEZ, H.; LEMESRE, J. L. & CARLIER, Y. Comparisons of immunological test for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 37, p.231-238, 1985.

BUJAK, M.; FRANGOIANNIS, N.G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. **Cardiovascular Research**, v. 74, p. 184-195, 2007. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.10.002

BURLEIGH, B.A.; CALER, E.V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 136, p. 609–620, 1997. DOI: 10.1083/jcb.136.3.609

BURLEIGH, B.A. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? **Science Signaling**, v. 2005, p. e36, 2005. DOI: 10.1126/stke.2932005pe36

BUSILLO, J.M; BENOVIĆ, J.L. "Regulation of CXCR4 signaling." **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 952-963, 2007. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.11.002

CAMPOS, M.A.; GAZZINELLI, R.T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-Like receptors. **Mediators of Inflammation**, v.13, p.139-143, 2004. DOI: 10.1080/09511920410001713565

CANÇADO, J.R.; MARRA, U.D.; BRENER, Z. Clinical therapeutic trial of 5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone (nitrofurazone) in the chronic form of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 6, p. 12-16, 2002.

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. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00659

CARLIER, Y.; BRENIERE, F.S.; LEMESRE, J.L.; CARRASCO, R.; DESJEUX, P.; AFCHAIN, D. The interest of immunoprecipitation test in the immunological diagnosis of Chagas' disease. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v. 65, p. 85-94, 1985.

CARVALHO, N.B.; ATALA, M.M.; LEITE, R.M.; YASUDA, M.A.S. Manual de atendimento a pacientes com doença de Chagas. Dados eletrônicos. São Paulo: Faculdade de Medicina USP, 2015.

CASTELLANO, F.; CHAVRIER, P.; CARON, E. Actin dynamics during phagocytosis. **Seminars in immunology**, v. 13, p. 347-355, 2001. DOI: 10.1006/smim.2001.0331

ÇAY, T. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the literature. **Turkish Journal of Pathology**, v.28 p. 1-10, 2012. DOI: 10.5146/tjpath.2012.01090

CESTARI, I., EVANS-OSSES, I.; SCHLAPBACH, L.J.; DE MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M.I. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology**, v. 53, p. 328-334, 2013. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.08.015

CHAGAS, C. Trypanosomíase americana: forma aguda da moléstia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.8, p.37-60, 1916. DOI: 10.1590/S0074-02761916000200003

CHAGAS, E. Infection expérimentale de l'homme par le Schizotrypanum cruzi. **Comptes rendus des seances de la société de biologie et de ses filiales**, v.121, p.769-771,1936.

CHEN, J.; HAO, W.; CHANG, K.; LIU, J. LBOS 02-03 the infiltrating macrophage-secreted galectin-3 plays an essential role in cardiac fibrosis and diastolic function in murine pressure-overload model. **Journal of Hypertension**, v. 34, p. e549, 2016. DOI: 10.1097/01.hjh.0000501503.60171.8b

CHUENKOVA, M.V.; FURNARI, F.B.; CAVENEE, W.K.; PEREIRA, M.A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: A Potent and Specific Survival Factor for Human Schwann Cells by Means of Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 9936-9941, 2001. DOI: 10.1073/pnas.161298398

CIMO, P.L.; LUPER, W.E.; SCOUROS, M.A. Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. **Texas Medicine**, v. 89, p. 48-50, 1993.

CLASER, C.; CURCIO, M.; DE MELLO, S.M.; SILVEIRA, E.V.; MONTEIRO, H.P.; RODRIGUES, M.M. Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. **BMC Cell Biology**, v. 9, p. 1-12, 2008. DOI: 10.1186/1471-2121-9-68

CLEMENTE, T. M. **A atividade da proteína recombinante P21-HIS₆, baseada na proteína nativa, secretada por *Trypanosoma cruzi*, é dependente de qual via de sinalização?** Orientador: Claudio Vieira da Silva. Monografia (Graduação em biologia), Instituto de Biologia - Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado, p.1-60, 2012.

COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 37-49, 1999. DOI: 10.1590/S0074-02761999000700004

COURA, J.R.; DE ABREU, L.L.; DUBOIS, L.E.; LIMA, F.D.; DE ARRUDA JÚNIOR, E.; WILLCOX, H.P.; ANUNZIATO, N.; PETANA, W. Morbidity of Chagas' disease. II - Sectional studies in 4 field areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, p.101-124, 1984.

CRUZ, M.C.; SOUZA-MELO, N.; DA SILVA, C.V.; DAROCHA, W.D.; BAHIA, D.; ARAUJO, P. R.; TEIXEIRA, S.R.; MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: role of delta-amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. **PLoS One**, v. 7, p. e51804, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0051804

DA SILVA, A.A.; TEIXEIRA, T.L.; TEIXEIRA, S.C.; MACHADO, F.C.; DOS SANTOS, M.A.; TOMIOSSO, T.C.; TAVARES P.C.B.; BRÍGIDO, R.T.E.S.; MARTINS, F.A.; SILVA, N.S.L.; RODRIGUES, C.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MORTARA, R.A.; LOPES, D.S.; ÁVILA, V.M.R.; DA SILVA, C.V. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 463, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00463

DA SILVA, C.V.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; MORTARA, R.A. Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2120–2129, 2006. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.03.016

DE CASTILHOS, P. **Estudos farmacocinéticos da forma recombinante da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*.** Orientadora: Maria Aparecida de Sousa. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2017.

DE OLIVEIRA, F.L.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; DE SOUZA, E.M.; DE OLIVEIRA, G.M.; DEGRAVE, W.M.; FEIGE, J.J.; BAILLY, S.; WAGHABI, M.C. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1696, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001696

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

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, p. e295394, 2010. DOI: 10.1155/2010/295394

DIAS, J.C.; DIAS, E.; MARTINS-FILHO, A.O.; FILHO, O.M.; VITELLI-AVELAR, D.; CORREIA, D.; LAGES, E.; PRATA, A. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 505–506, 2008. DOI: 10.1590/S0037-86822008000500014

DIAS, J.C.P. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine (WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A. Eds.). **International Society of Blood Transfusion**, p. 49-80, 1992.

DOS SANTOS, M.A. **A infecção das células B por *Trypanosoma cruzi* resulta em ativação da caspase-7, clivagem proteolítica da PCL γ 1 e morte celular.** Orientador: Claudio Vieira da Silva. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2017.

DOS SANTOS, M.A.; TEIXEIRA, F.B.; MOREIRA, H.H.T.; RODRIGUES, A.A.; MACHADO, F.C.; CLEMENTE, T.M.; BRIGIDO, P.C.; SILVA, R.T.; PURCINO, C.; GOMES, R.G.B.; BAHIA, D.; MORTARA, R.A.; MUNTE, C.E.; HORJALES, E.; SILVA, C.V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4259, 2014. DOI: 10.1038/srep04259

DOS REIS, G.A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Today**, v. 13, p. 335–342, 1997.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1760, p.616-635, 2006. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.12.020

EL BOUHDIDI, A.; TRUYENS, C.; RIVERA, M.T.; BAZIN, H.; CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic both hypergammaglobulinemia and parasite-specific response involving high levels of IgG2a and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunology**, v. 16, p. 69-76, 1994.

ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.13, p. 34–45, 2013. DOI: 10.1038/nri3345

EPTING, C.L.; COATES, B.M.; ENGMAN, D.M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 283-291, 2010. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.023

FARNWORTH, S.L.; HENDERSON, N.C.; MACKINNON, A.C.; ATKINSON, K.M.; WILKINSON, T.; DHALIWAL, K.; HAYASHI, K.; SIMPSON, A.J.; ROSSI, A.G.; HASLETT, C.; SETHI, T. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal

pneumonia by augmenting neutrophil function. **The American Journal of Pathology**, v. 172, p. 395-405, 2008. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070870

FERNANDES, P.C.C. **Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi*.**

Orientador: Claudio Vieira da Silva. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2013.

FERREIRA, D.; CORTEZ, M.; ATAYDE, V.D.; YOSHIDA, N. Actin cytoskeleton-dependent and - independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5522-5528, 2006. DOI: 10.1128/IAI.00518-06

FLORES-C HAVEZ, M.; FERNANDEZ, B.; PUENTE, S.; TORRES, P.; RODRÍGUEZ, M.; MONEDERO, C.; CRUZ, I.; GÁRATE, T.; CAÑAVATE, C. Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 44-47, 2008. DOI: 10.1086/527448

FREITAS-FILHO, G.A.; SILVA, M.F.R.; BELETTI, M.E.; MACHADO, E.R.; SILVA, N.S. Efeito da irradiação laser de baixa potência Arsianeto de Gálio Alumínio (ASGAAL) de 784 nm sobre a cicatrização de lesão muscular: estudo experimental. **Revista UNIVAP**, v.13, p. 53-60, 2006.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONCALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. e24, 2006. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020024

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicina Clínica (Barcelona)**, v. 148, p. 125-131, 2017. DOI: 10.1016/j.medcli.2016.10.038

FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in Cancer Biology**, v. 27, p. 30–38, 2014. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.03.004

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P; HEINY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2501-2506, 1992. DOI: 10.1002/eji.1830221006

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitismo. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 835–906, 2006. DOI: 10.1038/nri1978

GIORDANO, R.; FOUTS, D.L.; TEWARI, D.; COLLI, J.E. MANNING, M.J. ALVES, Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 3461-3468, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.6.3461

GRANT, I.H.; GOLD, J.W.; WITTNER, M. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, p. 849-851, 1989.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R.T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, p. 399-409, 2004. DOI: 10.1080/08916930410001713115

GUIÑAZÚ, N.; PELLEGRINI, A.; CARRERA-SILVA, E. A.; AOKI, M. P.; CABANILLAS, A. M.; GIRONÉS, N.; FRESNO, N.; CANO, R.; GEA, S. Immunisation with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1243-1254, 2007. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.03.010

HALL, B.S.; PEREIRA, M.A. Dual role for transforming growth factor β -dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2077-2081, 2000. DOI: 10.1128/iai.68.4.2077-2081.2000

HALL, B.S.; WILKINSON, S.R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 115-123, 2012. DOI: 10.1128/AAC.05135-11

HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, p. aaf4268, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf4268

HERRERA, R.N.; DE AMAYA, E.I.D.; AGUILAR, R.C.P.; TURONI, C.J.; MARAÑÓN, R.; BERMAN, S.G.; LUCIARDI, H.L.; COVIELLO, A.; DE BRUNO, M.P. Inflammatory and prothrombotic activation with conserved endothelial function in patients with chronic, asymptomatic Chagas disease. **Clinical and Applied Thrombosis/ Hemostasis**, v. 17, p. 502-507, 2011. DOI: 10.1177/1076029610375814

HERRERA, R.N.; DIAZ, E.; AGUILAR R.C.P.; BIANCHI, J.; BERMAN, S.; LUCIARDI, H.L. Prothrombotic state in early stages of chronic Chagas' disease. Its association with thrombotic risk factors. **Archivos de Cardiología de México**, v. 75, p. 38-48, 2005.

HOUZELSTEIN, D.; GONCALVES, I.R.; FADDEN, A.J.; SIDHU, S.S.; COOPER, D.N.; DRICKAMER, K.; LEFFLER, H.; POIRIER, F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.1177-1187, 2004. DOI: 10.1093/molbev/msh082

HU, C.Y.; CHANG, S.K.; WU, C.S.; TSAI, W.I.; HSU, P.N. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in

Taiwan. **Clinical Rheumatology**, v. 30, p. 1227–1233, 2011. DOI: 10.1007/s10067-011-1741-2

IANTORNO, G.; BASSOTTI, G.; KOGAN, Z.; LUMI, C.M.; CABANNE, A.M.; FISOGNI, S.; VARRICA, L.M.; BILDER, C.R.; MUNOZ, J.P.; LISERRE, B.; MORELLI, A.; VILLANACCI, V. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.31, p.460–468, 2007. DOI: 10.1097/01.pas.0000213371.79300.a8

IPPEL, H.; MILLER, M.C.; VÉRTESY, S.; ZHENG, Y.; CAÑADA, F.J.; SUYLEN, D.; UMEMOTO, K.; ROMANÒ, C.; HACKENG, T.; TAI, G.; LEFFLER, H.; KOPITZ, J.; ANDRÉ, S.; KÜBLER, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; OSCARSON, S.; GABIUS, H.J.; MAYO, K.H. Intra- and intermolecular interactions of human galectin-3: assessment by full-assignment-based NMR. **Glycobiology**, v. 26, p. 888–903, 2016. DOI: 10.1093/glycob/cww021

JANEWAY, C. A. Presidential Address to The American Association of Immunologists. The road less traveled by: the role of innate immunity in the adaptive immune response. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 539-44, 1998.

JARA, M.; BERG, M.; CALJON, G.; DE MUYLDER, G.; CUYPERS, B.; CASTILLO, D.; MAES, I.; OROZCO, M.D.C.; VANAERSCHOT, M.; DUJARDIN, J.C.; AREVALO, J. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. **PLoS One**, v. 12, p. e0180532, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0180532

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D.C.; MELO, M.B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M.M.; GAZZINELLI, R.T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p. e29, 2010. DOI: 10.1017/S1462399410001560

KADROFSKE, M.M.; OPENO, K.P.; WANG, J.L. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, p. 7–20, 1998. DOI: 10.1006/abbi.1997.0447

KARLSSON, A.; CHRISTENSON, K.; MATLAK, M.; BJÖRSTAD, A.; BROWN, K.L.; TELEMO, E.; SALOMONSSON, E.; LEFFLER, H.; BYLUND, J. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. **Glycobiology**, v. 19, p. 16–20, 2009. DOI: 10.1093/glycob/cwn104

KIERSZENBAUM, F.; HOWARD, J.G. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming in the Biozzi high and low responder mice. **Journal of Immunology**, v. 116, p. 1208-1211, 1976.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in Parasitology**, v.21, p. 513–516, 2005. DOI: 10.1016/j.pt.2005.08.013

- KIM SJ, CHOI IJ, CHEONG TC, LEE SJ, LOTAN R, PARK SH, CHUN KH. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. **Gastroenterology**, v. 138, p. 1035-1045, 2010. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.09.061
- KIPNIS, T.L.; JAMES, S.L.; SHER, A.; DAVID, J.R. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibodydependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 47-53, 1981.
- KLESHCHENKO, Y.Y.; MOODY, T.N.; FURTAK, V.A.; OCHIENG, J.; LIMA, M.F.; VILLALTA, F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human artery smooth muscle cells. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6717-6721, 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.11.6717-6721.2004
- KOBAYASHI, Y.; TATENO, H.; OGAWA, H.; YAMAMOTO, K.; HIRABAYASHI, J. Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. **Methods in molecular biology**, v. 1200, p. 555–77, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-1292-6_45
- KOHATSU, L.; HSU, D.K.; JEGALIAN, A.G.; LIU, F.T.; BAUM, L.G. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 4718-4726, 2006.
- KUREISHY, N.; SAPOUNTZI, V.; PRAG, S. Fascins, and their roles in cell structure and function. **BioEssays**, v.24, p. 350–361, 2002. DOI: 10.1002/bies.10070
- KUWABARA, I.; LIU, F.T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 3939–3944, 1996.
- KYLE, A.; WEGNER. ADIB KEIKHOSRAV, I.; KEVIN, W. ELICEIRI.; CHAD M. VEZINA. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 65, p. 479-490, 2017. DOI: 10.1369/0022155417718541
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0
- LARANJA, F.S. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 10, p. 482-491, 1953.
- LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D.L.; TEIXEIRA, A.R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 63, p. 111-118, 2000.
- LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, v.19, p.433-440, 2004. DOI: 10.1023/B:GLYC.0000014072.34840.04

LEIBY, D.A.; LENES, B.A.; TIBBALS, M.A.; TAMES-OLMEDO, M.T. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1237-1239, 1999. DOI: 10.1056/NEJM199910143411615

LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N.W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, p. 401–413, 1990. DOI: 10.1084/jem.171.2.401

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; ORTIZ, P.A.; TREJO-VARÓN, J.A.; CARRANZA, J.C.; PINTO, M.C.; SERRANO, M.G.; BUCK G.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. 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. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.07.015

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 29–41, 2005. DOI: 10.1038/nrc1527

LOW, H.P.; PAULIN, J.J.; KEITH, C.H. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. **The Journal of Protozoology**, v. 39, p. 463–470, 1992.

LU, D.Y.; TANG, C.H.; YEH, W.L.; WONG, K.L.; LIN, C.P.; CHEN, Y.H.; LAI, C.H.; CHEN, Y.F.; LEUNG, Y.M.; FU, W.M. SDF-1 α up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia. **European Journal of Pharmacology**, v.613, p. 146-154, 2009. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.03.001

LUZ, J.G.G.; SOUTO, D.E.P.; MACHADO-ASSIS, G.F.; DE LANA, M.; LUZ, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; DAMOS, F.S.; MARTINS, H.R. Applicability of a novel immunoassay based on surface plasmon resonance for the diagnosis of Chagas disease. **Clinica Chimica Acta**, v.454, p.39–45, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2015.12.025

MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p.1-12, 2004.

MACHADO, F.C.; CRUZ, L.; SILVA, A.A.; CRUZ, M.C.; MORTARA, R.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, C.V. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**, v. 24, p. 179-184, 2014. DOI: 10.1093/glycob/cwt097

MAEDA, F.Y.; CORTEZ, C.; IZIDORO, M.A.; JULIANO, L.; YOSHIDA, N. Fibronectin-degrading activity of *Trypanosoma cruzi* cysteine proteinase plays a role in host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 5166–5174, 2014. DOI: 10.1128/IAI.02022-14

MAGALHÃES, L.M.; VIANA, A.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0003816, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003816

MAGDESIAN, M.H.; TONELLI, R.R.; FESSEL, M.R.; SILVEIRA, M.S.; SCHUMACHER, R.I.; LINDEN, R.; COLLI, W.; ALVES, M.J. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Cell Research**, v. 313, p. 210–218, 2007. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.10.008

MAGDESIAN, M.H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 19382–19389, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M011474200

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMOES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v.115, p.1109-1123, 2007. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296

MARTINS, F. A. **Citocinas, citoesqueleto de actina e a P21 de *Trypanosoma cruzi* na multiplicação intracelular do parasito in vitro.** Orientador: Claudio Vieira da Silva. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2015.

MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS, A.N.J.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p.167–174, 2014. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.10.002

McHARDY, N. Passive immunization of mice against *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. **Tropenmedizin Parasitologie**, v. 28, p. 195-201, 1977.

MEJIA, A.M.; HALL, B.S.; TAYLOR, M.C.; GÓMEZ-PALACIO, A.; WILKINSON, S.R.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; KELLY, J.M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, p. 220–228, 2012. DOI: 10.1093/infdis/jis331

MENON, R.P.; HUGHES, R.C. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v.264, p.569-576, 1999.

MICALLEF, M. J.; OHTSUKI, T.; KOHNO, K.; TANABE, F.; USHIO, S.; NAMBA, M.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; FUJII, M.; IKEDA, M.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M. Interferon- γ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production.

European Journal of Immunology, v. 26, p. 1647–51, 1996. DOI: 10.1002/eji.1830260736

MILLER, M. C.; IPPEL, H.; SUYLEN, D.; KLYOSOV, A.A.; TRABER, P.G.; HACKENG, T.; MAYO, K.H. Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. **Glycobiology**, v. 26, p. 88–99, 2016. DOI: 10.1093/glycob/cwv073

MINEO, J. R.; Normas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. (Ed). **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**, Uberlândia: Edufu, p. 81-111, 2005.

MING, M.; CHUENKOVA, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, p. 243-252, 1993.

MING, M.; EWEN, M.E.; PEREIRA, M.E.A. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. **Cell**, v. 82, p. 287- 296, 1995. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90316-X

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000900005

MOODY, T.N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Letters**, v.470, p.305-308, 2000.

MORE, S.K.; CHIPLUNKAR, S.V.; KALRAIYA, R.D. Galectin-3-induced cell spreading and motility relies on distinct signaling mechanisms compared to fibronectin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 416, p. 179–191, 2016. DOI: 10.1007/s11010-016-2706-1

MOTT, A.; LENORMAND, G.; COSTALES, J.; FREDBERG, J.J.; BURLEIGH, B.A. Modulation of Host Cell Mechanics by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, p. 315–322, 2009. DOI: 10.1002/jcp.21606

NEIRA, I.; FERREIRA, A.T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 405-414, 2002.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. **Current opinion in cell biology**, v. 16, p. 422-428, 2004. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.06.006

NISHI, Y.; SANO, H.; KAWASHIMA, T.; OKADA, T.; KURODA, T.; KIKKAWA, K.; KAWASHIMA, S.; TANABE, M.; GOTO, T.; MATSUZAWA, Y.; MATSUMURA, R.; TOMIOKA, H.; LIU, F.T.; SHIRAI, K. Role of Galectin-3 in

Human Pulmonary Fibrosis. **Allergology International**, v. 56, p. 57–65, 2007. DOI: 10.2332/allergolint.O-06-449

NORRIS, K.A.; BRADT, B.; COOPER, N.R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **The Journal of Immunology**, v. 147, p. 2240-2247, 1991.

OKABE, K.; KIPNIS, T.L.; CALICH, V.L.G.; DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigotes bloodstream forms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 46, p. 344-353, 1980.

OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1390–1402, 2012.

PARK, A.M.; HAGIWARA, S.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; YOSHIE, O. Galectin-3 plays an important role in innate immunity to gastric infection by *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 1184–1193, 2016. DOI: 10.1128/IAI.01299-15

PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.J.N. The role of nitric oxide in immune response against *Trypanosoma cruzi* infection. **The Open Nitric Oxide Journal**, v.2, p. 1-6, 2010.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochemical Journal**, v. 410, p. 359-368, 2008. DOI: 10.1042/BJ20071138

PIACENZA, L.; ZAGO, M.P.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; BASOMBRI, M.A.; RADI, R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1455-1464, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.05.010

PINAZO, M.J.; TASSIES, D.; MUÑOZ, J.; FISA, R.; POSADA, E.J.; MONTEAGUDO, J.; AYALA, E.; GÁLLEGO, M.; REVERTER, J.C.; GASCON, J. Hypercoagulability biomarkers in *Trypanosoma cruzi* -infected patients. **Thrombosis Haemostasis**, v. 106, p. 617–623, 2011.

PINHEIRO, S.W.; RUA, A.M.O.; ETCHEBEHERE, R.M.; CANÇADO, C.G.; CHICA, J. E.L.; LOPES, E.R.; ADAD, S.J. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 461-466, 2003. DOI: 10.1590/S0037-86822003000400005

PITCOVSKY, T.A.; BUSCAGLIA, C.A.; MUCCI, J.; CAMPETELLA, O. A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 397-404, 2002. DOI: 10.1086/341463

PRINCEN, K.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; DE CLERCQ, E.; SCHOLS, D.

Evaluation of SDF-1/CXCR4-induced Ca²⁺ signaling by fluorometric imaging plate reader (FLIPR) and flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 51, p. 35-45, 2003. DOI: 10.1002/cyto.a.10008

RADER, R.A. (Re)defining biopharmaceutical. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 743–751, 2008. DOI: 10.1038/nbt0708-743

RAIMOND, J.; ZIMONJIC, D.B.; MIGNON, C.; MATTEI, M.; POPESCU, N.C.; MONSIGNY, M.; LEGRAND, A. Mapping of the galectin3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region14q21–22. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 706–707, 1997.

RAMIREZ, M.I.; RUIZ RDE, C.; ARAYA, J.E.; DA SILVEIRA, J.F.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 3636-3641, 1993.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.152-158, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000900021

RASSI, A.; NETO, J.A.M. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X

REGUEIRO, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, A.; SITGES, M.; ORTIZ-PÉREZ, J.T.; DE CARALT, M.T.; PINAZO, M.J.; POSADA, E.; HERAS, M.; GASCÓN, J.; SANZ, G. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. **International Journal of Cardiology**, v. 165, p. 107-112, 2013. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.07.089

REIGNAULT, L.C.; BARRIAS, E.S.; MEDEIROS, L.C.S.; DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.U. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2323-2333, 2014. DOI: 10.1007/s00436-014-3887-8

REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIÈRE, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 30-39, 1998. DOI: 10.1006/expr.1998.4216

RIBEIRO, A.L.; ROCHA, M.O.; TERRANOVA, P.; CESARANO, M.; NUNES, M.D.; LOMBARDI, F. T-wave amplitude variability and the risk of death in Chagas disease. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 22, p. 799-805, 2011. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2010.02000.x

ROCHA, A.; RAMOS JR, A.N; OSTERMAYER, A.L; MORENO, A.M.M.; *et al.* Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, 2005.

RODRIGUES, A.A. **Estudo da suscetibilidade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi* a componentes do sistema imune inato e adaptativo. Avaliação da atividade pró-fagocítica da P21-His6.** Orientador: Claudio Vieira da Silva. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

RODRIGUES, A.A.; CLEMENTE, T.M.; SANTOS, M.A.; MACHADO, F.C.; GOMES, R.G.B.; MOREIRA, H.H.T.; CRUZ, M.C.; BRIGIDO, P.C.; SANTOS, P.C. F.; ALVES, F.; BAHIA, D.; MARICATO, J.T.; JANINI, L.M.R.; HORJALES, E.; MORTARA, R.A.; SILVA, C.V. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One**, v. 7, p. e51384, 2012a. DOI: 10.1371/journal.pone.0051384

RODRIGUES, A.A.; SAOSA, J.S.; DA SILVA, G.K.; MARTINS, F.A.; DA SILVA, A.A.; SOUZA NETO, C.P.; HORTA, C.V.; ZAMBONI, D.S.; DA SILVA, J.S.; FERRO, E.A.; DA SILVA, C.V. IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, p. e1598, 2012b. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001598

RODRIGUES, C.C. **A imunização com a proteína recombinante P21 diminui a carga parasitária e reduz a fibrose no coração dos animais infectados por *Trypanosoma cruzi*.** Orientador: Claudio Vieira da Silva. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2018.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 381, p. 213-224, 2000. DOI: 10.1006/abbi.2000.1958

RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, I.; CHUNG, A.; BERLOT, C.H.; ANDREWS, N.W. cAMP Regulates Ca²⁺-dependent Exocytosis of Lysosomes and Lysosome-mediated Cell Invasion by Trypanosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 16754–16759, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.24.16754

ROLAND, J.; MURPHY, B.J.; AHR, B.; ROBERT-HEBMANN, V.; DELAUZUN, V.; NYE, K.E.; DEVAUX, C.; BIARD-PIECHACZYK, M. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. **Blood**, v. 101, p. 399-406, 2003. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0978

RUAS, L.P.; BERNARDES, E.S.; FERMINO, M.L.; de OLIVEIRA, L.L.; HSU, D.K.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2-biased immunity. **PLoS One**, v. 4, p. e4519, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0004519

SACCON, F.; GATTO, M.; GHIRARDELLO, A.; IACCARINO, L.; PUNZI, L.; DORIA, A. Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 1, p. 34–47, 2017. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.09.023

SALOMONSSON, E.; CARLSSON, M.C.; OSLA, V.; HENDUS-ALTENBURGER, R.; KAHL-KNUTSON, B.; OBERG, C.T.; SUNDIN, A.; NILSSON, R.; NORDBERG-KARLSSON, E.; NILSSON, U.J.; KARLSSON, A.; RINI, J.M.; LEFFLER, H. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.35079-35091, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.098160

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F.J.; PADILLA, A.; WANG, W.; ORR, D.; TARLETON, R.L. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. e34039, 2018. DOI: 10.7554/eLife.34039

SANO, H.; HSU, D.K.; YU, L.; APGAR, J.R.; KUWABARA, I.; YAMANAKA, T.; HIRASHIMA, M.; LIU, F.T. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **Journal of Immunology**, v.165, p. 2156–2164, 2000.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; DE CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 490-495, 2004. DOI: 10.1590/S0037-86822004000600012

SATO, S.; ST-PIERRE, C.; BHAUMIK, P.; NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble betagalactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunological Reviews**, v. 230, p. 172–187, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00790.x

SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 51–63, 1999. DOI: 10.1590/S0074-02761999000700005

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.A.; LIMA, A.P.C.A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 1289–1300, 2000. DOI: 10.1084/jem.192.9.1289

SCOTT, M.T.; GOSS-SAMPSON, M. Restricted IgG isotype profiles in *Trypanosoma cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. **Clinical Experimental Immunology**, v. 58, p. 372-379, 1984.

SEOK, J.K.; IL, J.C.; TEAK, C.C.; SANG, J.L; REUBEN, L.; SEOK, H.P.; KYUNG, H.C. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. **Gastroenterology**, v.138, p. 1035-1045, 2010. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.09.061

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 845-852, 2012. DOI: 10.1093/cid/cir956

SMITH, T. Parasitism and Disease. **Nature**, v. 136, 1935. DOI: 10.1038/136738a0

SILVA, C.V.; KAWASHITA, S.Y.; PROBST, C.M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M.C.; DA SILVA, E.A.; SOUTO-PADRÓN, T.C.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M.R.; ANDREWS, N.W.; MORTARA, R.A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v.11, p.563–570, 2009. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.03.007

SILVEIRA, A.B.; LEMOS, E.M.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J.B.; D'AVILA REIS, D. Megacolon in Chagas disease: A study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v.38, p.1256–1264, 2007. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.01.020

SIMON, H.J. Attenuated Infection. Philadelphia: Lippincott. p. 1-349, 1960.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Experimental Parasitology**, v. 74, p. 6-56, 1992.

STEINDEL, M., PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; PINTO, C.J.C.; GRISARD, E.C. Characterization of *T. cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25-32, 2008. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016

SUN, X.; CHENG, G.; HAO, M.; ZHENG, J.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; TAICHMAN, R.S.; PIENTA, K.J.; WANG, J. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, p. 709-722, 2010. DOI: 10.1007/s10555-010-9256-x

SWELLENGREBEL, N.H. The Efficient Parasite. **Science**, v. 92, p. 465-469, 1940. DOI: 10.1126/science.92.2395.465

SWYNGHEDAUW, B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. **The Journal of Experimental Biology**; v. 209, p. 2320-2327, 2006. DOI: 10.1242/jeb.02084

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

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.C.; RIBEIRO, A.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, M.M. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas Disease. **The journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 214-220, 2004. DOI: 10.1086/380803

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Review**, v. 5, p. 400-419, 1992. DOI: 10.1128

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, p. 1117–1130, 1992.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M.; ANDREWS, N. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1017–1022, 1994. DOI: 10.1084/jem.179.3.1017

TARLETON, R.L. The role of immunology in combating *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. **Revista Española De Salud Pública**, v. 87, p. 33–39, 2013.

TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, p. 233–238, 2015. DOI: 10.1007/s00281-015-0481-9

TEIXEIRA, S.C.; LOPES, D.S.; GIMENES, S.N.; TEIXEIRA, T.L.; DA SILVA, M.S.; BRIGIDO, R.T.; DA LUZ, F.A.C.; DA SILVA, A.A.; SILVA, M.A.; FLORENTINO, P.V.; TAVARES, P.C.B.; DOS SANTOS, M.A.; ÁVILA, V.M.R.; SILVA, M.J.B.; ELIAS, M.C.; MORTARA, R.A.; DA SILVA, C.V. Mechanistic insights into the anti-angiogenic activity of *Trypanosoma cruzi* protein 21 and its potential impact on the onset of chagasic cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44978, 2017. DOI: 10.1038/srep44978

TEIXEIRA, S.M.; RUSSELL, D.G.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. A differentially expressed gene family encoding “amastin,” a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 20509–20516, 1994.

TEIXEIRA, T.L.; MACHADO, F.C.; SILVA, A.A.; TEIXEIRA, S.C.; BORGES, B.C.; SANTOS, M.A.; MARTINS, F.A.; BRÍGIDO, P.C.; RODRIGUES, A.A.; NOTÁRIO, A.F.; FERREIRA, B.A.; SERVATO, J.P.; DECONTE, S.R.; LOPES, D.S.; ÁVILA, V.M.; ARAÚJO, F.A.; TOMIOSSO, T.C.; SILVA, M.J.; DA SILVA, C.V. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16877, 2015. DOI: 10.1038/srep16877

THOMAS, L.; PASQUINI, L.A. Extracellular Galectin-3 Induces accelerated oligodendroglial differentiation through changes in signaling pathways and cytoskeleton dynamics. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 336–349, 2019. DOI: 10.1007/s12035-018-1089-6

TONELLI, R.R.; GIORDANO, R.J.; BARBU, E.M.; TORRECILHAS, A.C.; KOBAYASHI, G.S.; LANGLEY, R.R.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e864, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000864

UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. **Immunological Letters**, v. 17, p. 85–89, 1988.

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

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K.E.; PRATAP, S.; BURNS, J.M.JR.; LIMA, M.F. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 2, p. 64–70, 1999. DOI: 10.1006/mcbr.1999.0150

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with Bze: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, p. 151-162, 1994.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 724–734, 2006.

VRAY, B.; CAMBY, I.; VERCROYSE, V.; MIJATOVIC, T.; BOVIN, N.V.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; KALTNER, H.; SALMON, I.; GABIUS, H.J.; KISS, R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, v.14, p.647-657, 2004. DOI: 10.1093/glycob/cwh068

WAGHABI, M.C.; DE SOUZA, E.M.; DE OLIVEIRA, G.M.; KERAMIDAS, M.; FEIGE, J.J.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; BAILLY, S. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4694-4701, 2009. DOI: 10.1128/AAC.00580-09

WANG, S.-F.; TSAO, C.-H.; LIN, Y.-T.; HSU, D.K.; CHIANG, M.L.; LO, C.H.; CHIEN, F.C.; CHEN, P.; ARTHUR CHEN, Y.M.; CHEN, H.Y.; LIU, F.T. Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. **Glycobiology**, v. 24, p. 1022–35, 2014. DOI: 10.1093/glycob/cwu064

WATFORD, W.T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J.J.O. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 361–368, 2003.

WENDT, M.K.; ALLINGTON, T.M.; SCHIEMANN, W.P. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. **Future Oncology**, v. 5, p. 1145-1168, 2009. DOI: 10.2217/fon.09.90

WHITE, M.J.; GALVIS-CARVAJAL, E.; GOMER, R.H. A brief exposure to tryptase or thrombin potentiates fibrocyte differentiation in the presence of serum or serum amyloid. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 142-150, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1401777

WILKOWSKY, S.E.; BARBIERI, M.A.; STAHL, P.; ISOLA, E.L.D. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. **Experimental Cell Research**, v. 264, p. 211–218, 2001. DOI: 10.1006/excr.2000.5123

WILKINSON, S.R.; OBADO, S.O.; MAURICIO, I.L.; KELLY, J.M. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 13453–13458, 2002. DOI: 10.1073/pnas.202422899

WOOLSEY, A.M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C.A.; BRACHMANN, S.M.; CANTLEY, L.C.; BURLEIGH, B.A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3611–3622, 2003. DOI: 10.1242/jcs.00666

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) The World Health Report 2002: Reducing Risk, Promoting Healthy Life. Geneva: World Health Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet (2018). Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acessado em: 05 de janeiro de 2019.

YAN, X.-J.; YU, G.-F.; JIE, Y.Q.; FAN, X.F.; HUANG, Q.; DAI, W.M. Role of galectin-3 in plasma as a predictive biomarker of outcome after acute intracerebral hemorrhage. **Journal of the neurological sciences**, v. 368, p. 121–7, 2016. DOI: 10.1016/j.jns.2016.06.071

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 82–91, 2008. DOI: 18512343

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 87–111, 2006. DOI: 10.1590/S0001-37652006000100010

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 101–107, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000900015

YOUNG, C.; LOSIKOFF, P.; CHAWLA, A.; GLASSER, L.; FORMAN, E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, v. 47, p. 540–544, 2007. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.01147.x

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature:

second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000700021

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.12.009

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, 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 144/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 018/15

Projeto Pesquisa: "Papel de anticorpos scFv na inibição das atividades
biológicas da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* *in vivo* e *in vitro*".

Pesquisador Responsável: Claudio Vieira da Silva

O protocolo 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: 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, 30 de julho de 2015.

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