



Universidade Federal De Uberlândia
Instituto De Ciências Biomédicas
Programa De Pós-Graduação Em Imunologia E Parasitologia Aplicadas

O papel da proteína rP21 na replicação parasitária *in vitro* e na infecção aguda experimental por
Trypanosoma cruzi

Flávia Alves Martins

Uberlândia

Junho-2019.



Universidade Federal De Uberlândia
Instituto De Ciências Biomédicas
Programa De Pós-Graduação Em Imunologia E Parasitologia Aplicadas

O papel da proteína rP21 na replicação parasitária *in vitro* e na infecção aguda experimental por
Trypanosoma cruzi

Flávia Alves Martins

Tese submetida ao Colegiado
do Programa de Pós-graduação
em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas, como requisito para
obtenção do título de Doutora
em Imunologia e Parasitologia.
Orientador: Prof. Dr. Claudio
Vieira da Silva

Uberlândia

Junho-2019.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M386 2019	<p>Martins, Flávia Alves, 1990- O papel da proteína rP21 na replicação parasitária in vitro e na infecção aguda experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i> [recurso eletrônico] / Flávia Alves Martins. - 2019.</p> <p>Orientador: Claudio Vieira da Silva. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2090 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Vieira da Silva, Claudio, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título. CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Flávia Alves Martins

“O papel da rP21 na replicação parasitária *in vitro* e na infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*”

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, 14 de junho de 2019.

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior
(UFTM)

Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
(UFTM)

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
(INGEB-UFU)

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior
(ICBIM-UFU)

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

*Aos meus pais, **Beatriz e José**, que foram a minha inspiração e motivação durante toda essa caminhada!*

*Ao meu marido **Renato**, pelo companheirismo, paciência e amor!*

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço primordialmente a Deus e a Nossa Senhora. Por mais clichê que possa parecer, a minha crença (ecumênica, mas honesta) em algo superior e extremamente forte, me forneceu combustível para insistir quando a vontade era desistir, persistir quando o desânimo falava alto.

Minha família possuiu papel imprescindível durante toda essa caminhada, e dedico essa conclusão tão significativa a eles. Em especial a meus pais, Beatriz e José, minha irmã Taís e a meu marido Renato. Dedico também aos nossos ‘auaus’ que são para mim membros da família, em especial à Kate e ao meu ‘pitchuco’ Marley. Que com seu amor incondicional e sua recepção calorosa, sempre me fornecem amor nos dias tristes.

Prof. Claudio, obrigada por toda confiança dispensada nesses 10 anos de convívio. Sou extremamente grata a todas oportunidades e ensinamentos que me foram oferecidos por ti. Muito obrigada MESTRE! Foram 10 anos de caminhada na pesquisa no LATRI. Iniciação Científica, Mestrado e por fim Doutorado. Nunca experimentei na minha vida, momentos tão enriquecedores quanto aqueles vividos em companhia de diversos amigos e colegas que por lá passaram. São 10 anos de auto superação, amadurecimento em todos os sentidos, e uma longa lista de aprendizados obtidos. O ‘LATRI’ esteve presente em diversos momentos da minha vida. Desde momentos tristes, até os momentos mais alegres. E sou extremamente GRATA a todos vocês, em especial as amizades verdadeiras e consistentes que daí brotaram ao longo desses 10 anos.

Agradeço aos professores da UFTM, Prof. Dr. Marcos Vinícius e Prof. Dr. Carlo Oliveira, pela colaboração neste trabalho. Aos meus amigos maravilhosos Adele, Aline, Fabrício e Marlus pela ajuda na correção da tese... não sei o que seria de mim sem vocês!

There's always, always something and someone to be thankful for!

Lista de Figuras

Figura 1. Formas de desenvolvimento de *T. cruzi*.

Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados e vertebrados.

Figura 3. Resumo do processo de purificação da proteína P21 recombinante.

Figura 4. A rP21 aumenta a polimerização do citoesqueleto de actina em mioblastos C2C12 e diminui a replicação intracelular de *T. cruzi*.

Figura 5. O tratamento com rP21 aumenta a produção de óxido nítrico (NO), IFN- γ e IL-4 por mioblastos infectados com cepa Y de *T. cruzi*, sem causar a morte do parasita.

Figura 6. O tratamento *in vivo* com rP21 altera a cinética da parasitemia e reduz a carga parasitária de *T. cruzi* no coração.

Figura 7. Imagens representativas de alterações histológicas cardíacas causadas pela infecção com 10^6 ou 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* e os efeitos do tratamento com rP21.

Figura 8. O tratamento com rP21 preserva a angiogênese cardíaca em animais infectados.

Figura 9. A rP21 diminui o recrutamento de mastócitos no tecido cardíaco em animais infectados com 10^6 , mas não nos animais desprovidos de infecção.

Figura 10. A rP21 diminui área de fibrose e os níveis de colágeno tipo I e tipo III no tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*.

Figura 11. Camundongos tratados com rP21 apresentam altos níveis de IFN- γ e IL-10.

Figura 12. Os níveis de IL-4 e TNF- α não foram alterados com o tratamento com rP21.

Figura 13. rP21 atua como fator solúvel agindo como indutor da dormência de *T. cruzi*.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise qualitativa das alterações no tecido cardíaco.

Lista de abreviações e siglas

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
DAPI	4',6-diamino-2-fenilenoindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IgG	Imunoglobulinas G
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kDa	Quilodalton
mL	Mililitro
NO	Óxido Nítrico
°C	Graus Celsius
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> pH 7,2 (Tampão fosfato salino)
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% azida (NaN ₃)
PGN- Sap	Solução contendo PGN + 0,1% saponina
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
PPD	Parafenilendiamina
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TCT	Tripomastigota de cultura de tecido
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i> (Tetrametil rodamina isotiocianato)
VERO	Fibroblastos de rim de macaco verde da África
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
MIP-1α	<i>Macrophage Inflammatory Proteins 1 α</i>
MIP-1β	<i>Macrophage Inflammatory Proteins 1 β</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
IL-12	Interleucina 12
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IFN-γ	Interferon-gama
DC	Doença de Chagas
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
IL-17	Interleucina 17

IL-2	Interleucina 10
APC	Célula apresentadora de antígeno
NK	Célula exterminadora natural (<i>Natural killer</i>)
IL-6	Interleucina 6
CD-4	Grupamento de diferenciação 4
CD-8	Grupamento de diferenciação 8
IL-9	Interleucina 9
DTUs	<i>Discrete Typing Units</i>
SDF-1α	<i>Stromal cell-derived factor 1 alfa</i>
rP21	Proteína recombinante baseada na P21 de <i>Trypanosoma cruzi</i>
MPO	Mieloperoxidase
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
M	Molar
min	Minuto
G	Grama
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
mm	Milímetro
IgG	Imunoglobulina G
V/V	Volume por volume
H₃PO₄	Ácido Fosfórico
μM	Micromolar
nm	Nanômetro
NO₂	Nitrito
HE	Hematoxilina e Eosina
mm²	Milímetro quadrado
RNA	Ácido ribonucleico
ng	Nanograma
mg	Miligrama
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidase de rábano)
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
N	Normal
f-actina	Actina filamentosa
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
pg	Picograma
dpi	Dias pós-infecção
AFAP1	<i>Actin Filament Associated Protein 1</i>
AFAP1L1	<i>Actin Filament Associated Protein 1 Like 1</i>

Sumário

Resumo	14
Abstract	15
1. Introdução	16
1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas	16
1.2 O ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.3 Variabilidade genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.4 Manifestações clínicas da doença	21
1.4.1 Fase aguda	21
1.4.2 Fase crônica	21
1.4.3 Patologia da cardiomiopatia chagásica	22
1.4.4 Diagnóstico e tratamento da doença de Chagas	24
1.5 Variabilidade genética de <i>T. cruzi</i>	26
1.6 Proteínas envolvidas na interação entre <i>T. cruzi</i> e a célula hospedeira	28
1.7 A proteína recombinante rP21	30
2. Justificativa	32
3. Objetivos	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4. Material e Métodos	34
4.1 Cultura de células	34
4.2 Cultura de parasitos	35
4.3 Animais	35
4.4 Purificação da rP21	35
4.4 Análise da polimerização do citoesqueleto de actina por microscopia confocal	37
4.5 Avaliação por citometria de fluxo da polimerização do citoesqueleto de actina	38
4.6 Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	38
4.7 Análise por citometria de fluxo da multiplicação parasitária	39
4.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)	39
4.9 Dosagem de citocinas do sobrenadante de células infectadas com <i>T. cruzi</i>	39
4.10 Análise da viabilidade de amastigotas intracelulares	40
4.11 Infecção experimental	41
4.12 Análises histológicas	42
4.13 Quantificação de carga parasitária por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	42
4.14 Dosagem dos níveis de citocinas no tecido cardíaco, esplênico e soro	43
4.15 Reação de imunofluorescência indireta	43
4.16 Avaliação da produção de P21 nativa por amastigotas intracelulares e epimastigotas submetidos a diferentes tipos de estresses	44
4.17 Análise estatística	46
4.18 Normas de biossegurança	46
5. Resultados e Discussão	46

5.1	rP21 aumenta a polimerização do citoesqueleto de actina em células C2C12 e diminui a multiplicação de <i>T. cruzi in vitro</i>	46
5.2	O tratamento com a rP21 altera o perfil de parasitemia e diminui a carga parasitária de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco.....	53
5.3	A proteína P21 recombinante diminui o dano cardíaco, preservando a arquitetura vascular, diminuindo fibrose e o infiltrado inflamatório	56
5.4	rP21 estimula a produção simultânea de IFN- γ e IL-10 <i>in vivo</i>	68
5.5	A rP21 como potencial fator solúvel para a dormência induzida por estresse de <i>T. cruzi</i>	72
6.	Conclusão	77
7.	Referências Bibliográficas	78
8.	Anexo (Aprovação do comitê de ética em uso de animais nº 087/15).....	98

Resumo

A proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* (P21) tem sido associada a diversas atividades biológicas, como a indução da fagocitose e a polimerização do citoesqueleto de actina. Neste estudo, foi investigado o papel da P21 na replicação do parasita e seu efeito na infecção experimental aguda. Observamos que a forma recombinante da P21 (rP21) diminuiu a multiplicação das cepas G e Y de *T. cruzi* em mioblasto murino C2C12. Este fenômeno foi associado com maior polimerização do citoesqueleto de actina e aumento da produção de IFN- γ e IL-4. Durante a infecção experimental, menos ninhos de amastigotas cardíacos, infiltrado inflamatório e fibrose foram observados em camundongos infectados com a cepa Y e tratados com rP21. Nos camundongos tratados com rP21, o aumento observado na expressão de IFN- γ foi contrabalançado por níveis elevados de IL-10, o que foi consistente com a menor lesão tecidual no coração observado nesses camundongos. Também vimos que, após submetido ao estresse, *T. cruzi* produz mais P21. O aumento da produção de P21 e o consequente controle da replicação do parasita nos leva a crer que a P21 possa atuar como um fator solúvel desempenhando papel na dormência do parasita, resultando em condições propícias para perpetuação da infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro.

Palavras-chave: Doença de Chagas, P21, replicação parasitária, infecção experimental aguda, dormência de *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Trypanosoma cruzi P21 protein (P21) has been associated with several biological activities, such as induction of phagocytosis and actin cytoskeleton polymerization. In this study, we investigated the role of P21 on parasite replication and its effect on acute experimental infection. We observed that recombinant P21 (rP21) decreased the multiplication of the G and Y strains of *T. cruzi* in C2C12 myoblasts. This phenomenon was associated with greater actin polymerization and production of IFN- γ and IL-4. During experimental infection, lower cardiac nests, inflammatory infiltrate and fibrosis were observed in mice infected with the Y strain and treated with rP21. In rP21-treated mice, the observed increase in the expression of IFN- γ was counterbalanced by high levels of IL-10, which was consistent with the lower cardiac tissue injury found in these mice. We have also seen that upon stress, *T. cruzi* produced more P21. The increase in P21 production and the consequent control of parasite replication suggest that P21 is one of the soluble factors that lead to parasite dormancy, resulting in the perpetuation of *T. cruzi* infection in the host.

Keywords: Chagas disease, P21, parasites replication, acute experimental infection, *Trypanosoma cruzi* dormancy.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é um dos maiores problemas de saúde pública em cerca de 21 países, desde o sudeste dos EUA ao norte da Argentina e Chile (WHO, 2019). Tradicionalmente é confinada a regiões rurais e pobres da América do Sul e Central, onde a transmissão vetorial é a principal forma de contágio. Afeta principalmente populações de baixa condição socioeconômica e com baixa visibilidade, causando estigma e discriminação (VENTURA-GARCIA et al., 2013; PEREZ-MOLINA, MOLINA, 2018).

Migrações internas de áreas rurais para urbanas, transmissão congênita e doação de sangue tem levado a doença a regiões anteriormente não afetadas (BOWMAN et al., 2008; PEREZ-MOLINA, MOLINA, 2018). Foi relatado aumento significativo de casos confirmados nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e no continente europeu (COURA E VIAS, 2010; ÁLVAREZ et al., 2014). Por ser uma das doenças tropicais negligenciadas, listadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência global tem sido estimada entre 9 e 10 milhões de pessoas infectadas, com cerca de 10.000 mortes anuais (RODRIGUES DOS SANTOS et al., 2018).

Desde o início dos anos 90, as principais medidas para controle da DC têm sido programas de controle vetorial e teste obrigatório em bancos de sangue (YAMAGATA, NAKAGAWA, 2006). Em consequência, a prevalência diminuiu substancialmente, sendo a transmissão vetorial interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e no Brasil em 2000 (WHI, 2002; SALVATELLA et al., 2014). A prevalência da infecção em imigrantes da América Latina residindo da Europa é de $4\pm 2\%$, sendo maior naqueles oriundos da Bolívia e Paraguai. Nos EUA, estima-se que cerca de 300.000 imigrantes estão infectados com *T. cruzi* (MANNE-GOEHLER et al., 2016; KRATZ et al., 2018).

No Brasil, no ano de 2006, esta doença foi responsável por 7% das mortes por insuficiência cardíaca. O custo global da DC tem sido estimado em US\$7,19 bilhões de dólares por ano, e apesar de sua alta incidência e custos econômicos, ainda não há tratamento farmacológico efetivo com poucas pesquisas que buscam novas opções terapêuticas (CLAYTON, 2010; SOUZA et al., 2010; WATANABE et al., 2016; ROBERTSON et al., 2016).

A transmissão vetorial é responsável por aproximadamente 70% dos casos, sendo a transmissão congênita responsável por 26%, e um pequeno número de pessoas (<1%) são

infectadas por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais ou consumo de alimentos contaminados (CONTEH et al., 2010; PEREZ-MOLINA, MOLINA, 2018). O aumento de surtos de casos agudos da tripanossomíase americana no Brasil, tem chamado a atenção de autoridades, as quais consideram a doença como emergente na região amazônica (BARBOSA et al., 2014).

Na maioria dos casos de surtos em território brasileiro, a investigação epidemiológica aponta para transmissão não-vetorial, implicando a transmissão oral. A mesma pode ocorrer devido ao consumo de alimentos derivados de frutas, água ou verduras contaminadas com fezes de triatomíneos ou secreção de animais infectados. No caso dos surtos na região amazônica, a principal planta suspeita de fonte de infecção é a *Euterpe oleracea*, o açaí, consumido amplamente como suco e polpa pastosa (XAVIER et al., 2014; SANTANA et al., 2019). Além disso, o consumo de carne malcozida de animais que são reservatórios do parasita, como o tatu (*Dasyypus* spp.), pode levar a transmissão (RUEDA et al., 2014).

1.2 O ciclo biológico de *T. cruzi*

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

O protozoário flagelado *T. cruzi* pertence ao Filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e apresenta três estágios evolutivos morfologicamente distintos: tripomastigota, amastigota e epimastigota (**Figura 1**). O processo de desenvolvimento de um estágio a outro é complexo, pois envolve mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

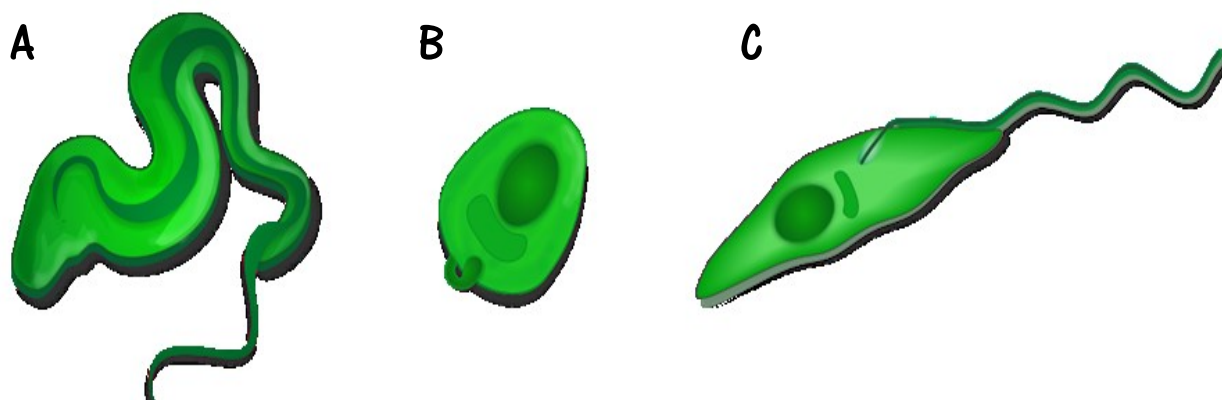


Figura 1. Formas de desenvolvimento de *T. cruzi*. (A) Tripomastigota. (B) Amastigota e (C) Epimastigota. Figura adaptada de DOS SANTOS, 2017.

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico e inclui um hospedeiro invertebrado, o qual é o vetor biológico da doença, sendo representado principalmente por insetos hemípteros dos gêneros *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp. e *Panstrongylus* spp. pertencentes a Família Reduviidae, e um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) (BARRETO, 1979). O ciclo se inicia quando o inseto triatomíneo ingere formas tripomastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo, em algum indivíduo infectado com *T. cruzi*. Quando esses parasitas atingem o intestino médio do vetor, se transformam em epimastigotas e passam a se multiplicar. Após algumas semanas, os epimastigotas migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (SOARES E SOUZA, 1991; VIDAL et al., 2016).

Ao realizar novo repasto sanguíneo, os insetos depositam suas fezes contendo as formas tripomastigotas próximo ao local da picada. Assim, a penetração destes no hospedeiro vertebrado pode ocorrer diretamente pela mucosa, caso a picada ocorra em local próximo a esta, pelo orifício deixado pela punção realizada pelo inseto vetor ou quando o indivíduo coça o local, o que pode acarretar lesão tecidual e facilitar assim o alcance da corrente sanguínea pelos parasitas (BARRETO, 1979).

Dentro do organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos conseguem invadir vários tipos de células nucleadas, com predileção por células do coração, cérebro e sistema gastrointestinal. Intracelularmente, os parasitas se reproduzem por fissão binária como amastigotas, e assim, quando a célula está abarrotada de parasitas, as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas e rompem as células, podendo então infectar novas células (**Figura 2**) (NAKAYASU et al., 2009; FERRARESSO et al., 2018).

1.3 Variabilidade genética de *T. cruzi*

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

cruzi, chamados de “*discrete typing units*” (DTUs), sendo denominados de TcI a TcVI, e recentemente foi proposto um sétimo grupo, Tcbat (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012; BERNIÈRE et al., 2016). Os grupos TcI e TcII são considerados ancestrais, sendo os demais grupos derivados desses dois (DA COSTA et al., 2014).

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

Diferenças nas manifestações clínicas causadas por *T. cruzi*, estão relacionadas com variabilidade genética tanto do hospedeiro quanto do parasita. Tais variações levam às diferenças no tropismo por tecidos e no desenvolvimento da doença (ANDRADE et al., 1999; ANDRADE et al., 2002; MACEDO et al., 2004; HISSA E ANDRADE, 2015). Neste trabalho, utilizamos a cepa G (pertencente a TcI), de baixa infectividade *in vivo*, e a cepa Y (pertencente a TcII), de alta infectividade *in vivo*. Estas duas cepas representam os dois maiores grupos genéticos de *T. cruzi* (MAGALHÃES et al., 2015).

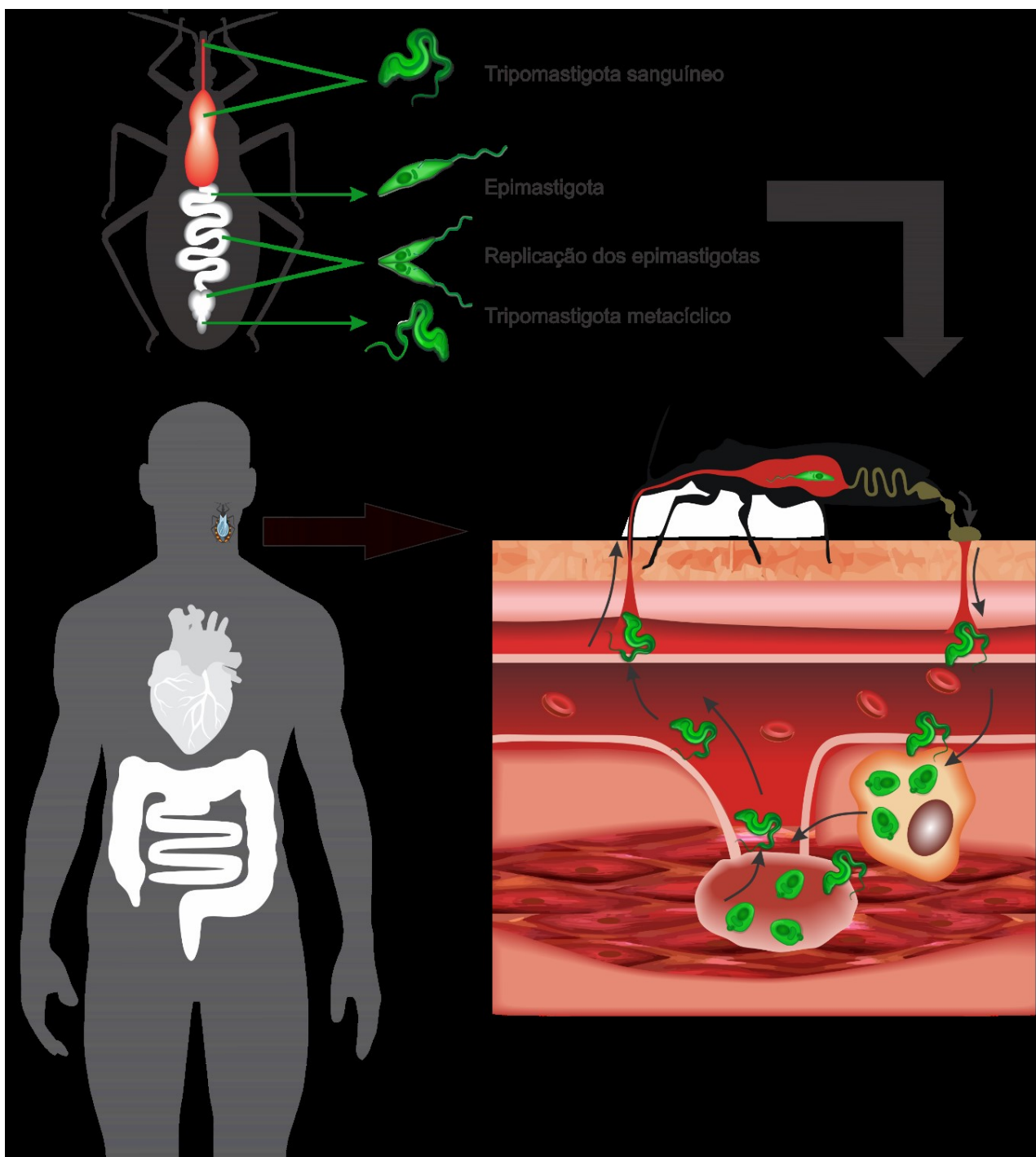


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados e vertebrados. (A) Ciclo biológico de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. O inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas ao realizar repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. Os tripomastigotas, ao chegarem no intestino médio do triatomíneo, se diferenciam em epimastigotas, forma replicativa no hospedeiro invertebrado. Os epimastigotas, no intestino posterior, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são liberados juntamente as fezes do inseto. (B) Ciclo biológico de *T. cruzi* no hospedeiro humano. O vetor ao realizar o repasto sanguíneo, libera tripomastigotas metacíclicos junto as fezes. O hospedeiro, ao coçar o local de picada, facilita a entrada do parasita na corrente sanguínea, que por sua vez, infecta células nucleadas. Dentro da célula, se diferencia em amastigota e se replica, até que preencha o citoplasma da célula. Antes da célula se romper, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, de modo que ao serem liberados no

espaço extracelular e corrente sanguínea, infectam outras células. O triatomíneo ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere junto ao sangue, formas tripomastigotas metacíclicas, dando assim continuidade ao ciclo. À esquerda são mostradas as principais complicações da fase crônica da infecção: cardiomegalia e megacólon. Figura adaptada de DOS SANTOS, 2017.

1.4.1 Manifestações clínicas da doença

1.4.1 Fase aguda

Após a infecção inicial, o período de incubação varia de 7 a 15 dias no caso de transmissão vetorial, e cerca de 30 a 40 dias na transmissão por transfusão. O período de incubação durante transmissão oral é significativamente menor que na transmissão mediada por vetor (RASSI et al., 2019; ECHEVERRIA E MORILLO, 2019).

A DC manifesta-se em duas fases principais: aguda e crônica. A fase aguda é a inicial e pode durar até dois meses após a ocorrência da infecção. Essa fase é autolimitada, com parasitemia patente ou subpatente, a qual não é encontrada em vários indivíduos infectados. Estes podem apresentar um quadro assintomático ou sintomas inespecíficos. Menos de 50% das pessoas recém-infectadas apresentam os primeiros sinais característicos da infecção. Estes sinais podem incluir febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios linfáticos, dor muscular, ou até mesmo envolvimento cardíaco (miocardite, cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e arritmias). No local de inoculação, um nódulo violeta eritematoso, conhecido como “chagoma de inoculação”, pode ocorrer. Se a infecção ocorrer via ocular, pode ser observado o complexo oftalmoganglionar, mais conhecido como sinal de Romaña. Este é caracterizado por edema bi-palpebral unilateral, conjuntivite e adenopatia local (FERRARESSO et al., 2018).

Ainda na fase aguda, os parasitas replicam ativamente em vários tipos celulares e tecidos diferentes, incluindo macrófagos, tecido muscular liso, estriado esquelético e estriado cardíaco, adipócitos, e células do sistema nervoso central (BOMBEIRO et al., 2012; ÁLVAREZ et al., 2014; WHO, 2019).

1.4.2 Fase crônica

Normalmente, o paciente não é diagnosticado na fase aguda, o que leva à progressão da doença para a fase crônica. Esta, por sua vez, pode se apresentar na forma indeterminada, cardíaca ou digestiva (GALLERANO et al., 2007; FERRARESSO et al., 2018). Na forma indeterminada, o

indivíduo não apresenta sintoma clínico relevante, e baixa ou nenhuma parasitemia. Enquanto muitos indivíduos infectados permanecem na forma indeterminada da doença e possuem sorologia positiva, uma proporção significativa (30-35%) dos pacientes, desenvolve manifestações cardíacas ou digestivas: uma cardiomiopatia que pode levar à insuficiência cardíaca congestiva; arritmia; megaesôfago; megacólon e, eventualmente, a morte (WHO, 2019).

Não é possível prever se o indivíduo na fase indeterminada irá progredir para o estado crônico sintomático da doença. No entanto, um tipo de microRNA circulante, o microRNA-208a, está sendo estudado como potencial biomarcador preditor de risco para a progressão da DC (LINHARES-LACERDA et al., 2018). Nesses indivíduos, a fase crônica permanece indeterminada, e pode envolver anos de acumulação indetectável de dano difuso do miocárdio, antes da detecção clínica (BONNEY et al., 2019).

A cardiomiopatia é a forma clínica mais importante da doença chagásica crônica, por causa da frequência de sua ocorrência (20-30% de indivíduos infectados), e por sua gravidade gerando altos índices de morbidade e mortalidade. É uma doença complexa que inclui um grande espectro de manifestações, desde pequeno envolvimento do miocárdio a disfunção sistólica ventricular esquerda, cardiomiopatia dilatada, arritmias, eventos tromboembólicos e insuficiências cardíaca terminal (TANOWITZ et al., 2015).

Em adição ao envolvimento cardíaco, a DC pode afetar o trato gastrointestinal e sistema nervoso. Os sintomas gastrointestinais em pacientes chagásicos crônicos são em maior parte resultado do dano da inervação entérica excitatória e inibitória por *T. cruzi* (MATSUDA et al., 2009). Embora as manifestações gastrointestinais mais comuns sejam megaesôfago e megacólon, essencialmente qualquer parte do trato gastrointestinal pode estar envolvido, desde as glândulas salivares até o reto (MATSUDA et al., 2009). A forma gastrointestinal da DC (~10%) é mais vista em indivíduos infectados residentes no sul do Equador, Brasil central e no cone sul da América do Sul, devido a variação subespecífica de *T. cruzi* (PEREZ-AYALA et al., 2011; BONNEY et al., 2019).

1.4.3 Patologia da cardiomiopatia chagásica

A patologia da DC é complexa, heterogênea e depende de muitas variáveis, com o parasita e hospedeiro sendo determinantes da imunidade e inflamação (MACHADO et al., 2012;

TEIXEIRA et al., 2006). Acredita-se que o processo inflamatório no coração se desenvolva aos poucos, a partir de pequena carga parasitária que persiste no coração. Mecanismos celulares e moleculares contribuem para a inflamação degenerativa e destrutiva, e para as respostas reparadoras. A soma de tais processos culmina em diferentes resultados da infecção: de ausência de doença até dano cardíaco com remodelamento tecidual, que pode levar à falência cardíaca e sequelas clínicas relacionadas, como acidente vascular cerebral (HIGUCHI MDE, 1997; BONNEY et al., 2019).

Na fase aguda, alterações cardíacas ocorrem nas primeiras semanas após a inoculação do parasito e, usualmente, dura de semanas a poucos meses (BENZIGER et al., 2018). No hospedeiro mamífero, *T. cruzi* inicia seu ciclo de reprodução próximo ao local de inoculação, com liberação de tripomastigotas capazes de infectar vários tipos celulares. Essencialmente, qualquer tipo de célula nucleada pode ser infectada por *T. cruzi*, sendo que no coração o parasita infecta cardiomiócitos, células endoteliais, neurônios, fibroblastos e adipócitos (LEWIS E KELLY, 2016; FERREIRA et al., 2011). O mecanismo por trás do tropismo cardíaco não foi determinado de forma concisa, mas parece estar relacionado com a alta capacidade de reparação da membrana plasmática existente nessas células, uma vez que a ruptura da membrana plasmática permite a entrada de Ca^{2+} , ativando mecanismos de reparo de membrana e aumentando a susceptibilidade celular à eventos de invasão por *T. cruzi* (FERNANDES E ANDREWS, 2012; BONNEY et al., 2019).

Dependendo da combinação da cepa de *T. cruzi* e as variações genéticas e imunológicas do hospedeiro, uma replicação intracardíaca fulminante pode ocorrer, com o acúmulo de grande número de amastigotas intracelulares que pode facilmente ser vistos por microscopia de luz, em estruturas semelhantes a “cistos”. Como cada “cisto” de amastigota consiste em um citoplasma parasitado de única célula, esta estrutura é um falso cisto ou pseudocisto (BONNEY et al., 2019).

As principais características da cardiomiopatia chagásica aguda, variam de mínimas modificações à dilatação atrial e ventricular, resultando em arquitetura globular em casos graves, devido ao aumento das câmaras sem hipertrofia das fibras cardíacas (ROSSI et al., 2003). Após algumas semanas, a resposta imune adaptativa se desenvolve no hospedeiro, o número de parasitas diminui drasticamente e a resposta imune celular diminui, usualmente com a resolução da inflamação no miocárdio. Anormalidades residuais da miocardite aguda inclui fibrose tecidual e hipertrofia dos cardiomiócitos (BONNEY et al., 2019).

Na cardiomiopatia chagásica crônica, pelo menos metade dos pacientes apresentam o coração com a parede ventricular incomumente delgada, geralmente na região apical do ventrículo esquerdo. A avaliação microscópica dessas áreas mostra atrofia de fibras miocárdicas, com infiltração de tecido conjuntivo denso e adipócitos entre o endocárdio e epicárdio. Normalmente o infiltrado inflamatório nessas áreas está ausente, e não há parasitas. Fibras colágenas formam grandes áreas de tecido cicatricial no miocárdio (ROSSI et al., 2003).

As fibras miocárdicas infectadas sob análise microscópica, evidenciam danos caracterizados por vacuolização, lise celular e degeneração miofibrilar. Tais alterações são invariavelmente acompanhadas de intenso infiltrado de células mononucleares, inicialmente composto por macrófagos e neutrófilos, e posteriormente por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos (ANDRADE, 1999; MARCON et al., 2011). Granulomas não-necrosantes pode estar presente com células gigantes multinucleadas (ROFFÊ et al., 2016). A destruição de nervos parassimpáticos na região epicárdico-mediastinal tem sido documentada, sugerindo um potencial mecanismo para ocorrência de arritmias e morte súbita (MIRANDA et al., 2011; BONNEY et al., 2019).

Outros fatores que contribuem para a resposta inflamatória exacerbada são a produção de citocinas, quimiocinas e seus receptores, a alta expressão de moléculas de adesão, ativação do complemento e de agregação plaquetária, junto a produção de anticorpos. Edema intersticial, hemorragia e vasculite podem estar presentes (BONNEY et al., 2019).

1.4.4 Diagnóstico e tratamento da DC

Na fase aguda da doença, o diagnóstico é realizado por métodos como microhematócrito, PCR de sangue periférico, cultura laboratorial do sangue, teste de gota espessa e xenodiagnóstico, sendo os dois últimos úteis se realizados em centros médicos especializados. Os parasitas são normalmente detectáveis no sangue por até 2 a 4 meses após a infecção, sendo posteriormente (fase crônica) identificados por reação em cadeia polimerase (PCR), ou indiretamente pela presença de anticorpos específicos anti - *T. cruzi* (BONNEY et al., 2018; GALLERANO et al., 2007; FERRARESSO et al., 2018).

O tratamento com drogas tripanomicidas é recomendado para a DC aguda, congênita, reativada e doença crônica em pacientes com menos de 18 anos. Uma vez que a persistência da

parasitose e inflamação crônica concomitante, leva a cardiomiopatia chagásica crônica, o tratamento é oferecido à pacientes com a forma indeterminada da doença e a pacientes com doença cardíaca leve a moderada (WHO, 2002; BERN et al., 2007; ANDRADE et al., 2011; PEREZ-MOLINA, MOLINA, 2018).

No entanto, as opiniões sobre o impacto do tratamento nesta fase diferem. Estudos indicaram que o efeito do tratamento com benznidazol tem efeitos semelhantes com o grupo placebo, não reduzindo os danos clínicos cardíacos em pacientes com doença moderada a grave (MORILLO et al., 2015). Por outro lado, o tratamento de mulheres grávidas se mostrou efetivo em interromper a transmissão vertical (MURCIA et al., 2013). O tratamento deve ser individualizado para pacientes com mais de 50 anos e para pacientes com comorbidades. Apenas duas drogas são licenciadas para o tratamento da DC, o benznidazol e nifurtimox, ambos utilizados há mais de 50 anos, possuindo eficácia distante do ideal (PEREZ-MOLINA, MOLINA, 2018). Apesar da eficácia relativa do tratamento em pacientes com cardiomiopatia crônica, a progressão da falência cardíaca é contínua (GUEDES et al., 2011; MORILLO et al., 2015; BONNEY et al., 2019).

1.5 Aspectos da resposta imune a DC

Durante a primeira fase da doença, o envolvimento do miocárdio é causado principalmente pela invasão do tecido cardíaco pelo parasita, conseqüentemente, desencadeando grave resposta imune e inflamatória (RASSI et al., 2019). A imunidade inata desenvolvida frente a infecção por *T. cruzi* é importante para prevenir proliferação intracelular exacerbada e possui papel até que seja desenvolvida resposta imune adaptativa antígeno-específica, a qual é responsável por eliminar as células infectadas. Todos os subgrupos de linfócitos são importantes para a resposta frente a essa infecção, sendo que a resposta T *helper* 1 (Th1) predomina no miocárdio e periféricamente (TARLETON, 1990; TARLETON et al., 1992; 1994; BONNEY et al., 2019). Essa resposta é caracterizada pela expressão do fator de transcrição Tbet e produção de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12, e TNF- α), o que é acompanhado da supressão dos níveis de fatores de transcrição e citocinas associadas a resposta Th2 (GATA-3, IL-4, e IL-10) e Th17 (IL-17) (SATHLER-AVELAR et al., 2012; GUEDES et al., 2012).

Assim que tripomastigotas caem na corrente sanguínea, as vias do complemento da lectina e alternativa são ativadas, uma vez que ambas não necessitam da presença de anticorpos específicos

anti - parasita (CESTARI et al., 2013). Colectinas e ficolinas reconhecem e se ligam a moléculas glicosiladas e acetiladas da superfície de tripomastigotas de *T. cruzi* ativando a via de lectina, sendo a via alternativa ativada pela hidrólise de C3 (LUZ et al., 2013; LUZ et al., 2016; LIDANI et al., 2017). No entanto, o parasita utiliza moléculas de superfície (calreticulina, proteína regulatória do complemento de *T. cruzi* – Gp160 e gp58/068), a fim de escapar da lise mediada pelo sistema complemento (LIDANI et al., 2017; FERREIRA et al., 2014; RAMIREZ-TOLOZA E FERREIRA, 2017). Estas proteínas atrapalham a ligação inicial das moléculas do complemento, inibindo a formação de C3 convertase, o que é um passo crucial para ativação das três vias e para geração dos efeitos mediados pelo complemento (CESTARI et al., 2013; TAMBOURGI et al., 1993; DE BONA et al., 2018).

Tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* não estão apenas envolvidos na expressão de moléculas regulatórias na superfície do parasito, mas também induzem a liberação de microvesículas de células hospedeiras que afetam a formação e ativação de C3 convertase (C4b2a), resultando na inibição da ativação do complemento, aumentando a sobrevivência do parasita e invasão de células hospedeiras por este (CESTARI et al., 2014; DE BONA et al., 2018).

Diferentes tipos celulares reconhecem *T. cruzi* e reagem de diferentes maneiras para controle da infecção. A detecção e destruição direta do parasita por fagócitos como macrófagos e células dendríticas, as quais são ativadas e se tornam células apresentadoras de antígenos (APCs), é essencial para início da resposta imune adaptativa. Células não hematopoiéticas são os primeiros alvos da invasão e contribuem para o controle da infecção (TELLERIA E TIBAYRENC, 2017; FRESNO E GIRONES, 2018).

Após a infecção pelo parasita, macrófagos secretam interleucina (IL)-12, a qual ativa células *natural killer* (NK) a produzir interferon - gama (IFN- γ) (ALIBERTI et al., 1996; ANTÚNEZ AND CARDONI, 2000), o que desempenha papel crucial na ativação de macrófagos. A citocina interferon-gama (IFN- γ) potencializa a atividade efetora dos macrófagos por indução da transcrição do gene produtor da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), notavelmente aumentando a produção de óxido nítrico, o qual possui importante efeito na morte de *T. cruzi* (MCCABE et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992; MUÑOZ-FERNÁNDEZ et al., 1992; GUERREIRO et al., 2015; FRESNO E GIRONES, 2018).

A administração de IFN- γ a camundongos na fase aguda da doença reduz a parasitemia e impede a morte dos animais, enquanto o tratamento com inibidores de óxido nítrico resulta em

aumento da parasitemia e da taxa de mortalidade dos camundongos infectados (REED, 1998; VESPA et al., 1994; PETRAY et al., 1995). Além disso, o IFN- γ promove a mudança das imunoglobulinas para subclasse IgG, com alto potencial de opsonização e ativação do sistema complemento, que atua na remoção de parasitas extracelulares liberados das células infectadas. Finalmente, a citotoxicidade de células T CD8+ também contribuem para o controle de *T. cruzi* por meio do reconhecimento e destruição de células que abrigam formas intracelulares do parasita (LOW et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2014).

As citocinas IL-12 e IL-18 possuem papel redundante na indução da produção de IFN- γ e controle da infecção por amastigotas da cepa G, como mostram os resultados obtidos por Rodrigues et al., (2012a). Ainda neste estudo, verificou-se que a citocina IFN- γ desempenha papel crucial no controle da infecção pela cepa G, sendo que a principal célula responsável pela produção dessa citocina foram células NK, uma vez que animais nocautes para CD4 e CD8 não apresentaram diferenças no curso da infecção (RODRIGUES et al., 2012a).

A resposta imune está diretamente envolvida com a forma que a doença se apresentará na fase crônica. Pacientes com a forma indeterminada da doença, apresentam um perfil de citocinas anti-inflamatórias produzidas pelas células circulantes, enquanto pacientes com cardiomiopatia chagásica, apresentam um perfil excessivamente pró-inflamatório (GOMES et al., 2005; GOMES et al., 2012; SOUSA et al., 2014; CHAVES et al., 2016).

Em indivíduos infectados portadores da doença cardíaca crônica, há produção de altos níveis de IFN- γ , TNF- α , e IL-6 com baixos níveis de IL-4 e IL-10 que aqueles na fase indeterminada (GOMES et al., 2003). Isso promove a diferenciação Th1 e proliferação de células-T CD4+, levando a ativação de resposta antiparasitária por células-T CD8+ e macrófagos (DA MATA GUEDES et al., 2010; BONNEY et al., 2019).

Durante a infecção aguda pela cepa CL, foi verificada alta expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. No entanto, citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-9 foram também altamente produzidas. Tal padrão misto de citocinas pode contribuir para a permanência da infecção, favorecendo o processo de cronicidade da mesma. Por outro lado, o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias desempenha papel no controle do nível parasitário e fornece proteção contra o excesso de dano tecidual (GOMES et al., 2003; FLÓREZ et al., 2011; POVEDA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016).

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

Um importante fator para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica grave em humanos é a presença de resposta imune Th1 específica (GOMES et al., 2003), sendo que uma regulação parece ser necessária para evitar a progressão da doença. Nesse sentido, estudos em camundongos C57BL/6 mostraram o papel regulatório de IL-10 produzido por células T esplênicas em camundongos infectados com a cepa Tulahuén (SILVA et al., 1992) e um efeito protetor desta citocina em animais infectados com a cepa Colombiana (ROFFE et al., 2012, FRESNO E GIRONES, 2018).

O parasita é capaz de desencadear ambas respostas Th1 e Th2, dependendo da linhagem genética do camundongo, cepa do parasita e carga de inóculo. Comparando-se camundongos susceptíveis e não-susceptíveis, BALB/c e C57BL/6 respectivamente, infectados com a cepa Y, foi visto que a proteção depende do balanço Th1/Th2 (CUERVO et al., 2008; SANOJA et al., 2013). A produção de citocinas por linfócitos T infiltrados no coração no momento de pico da infecção, apresenta alto balanço de citocinas Th1/Th2 em animais não susceptíveis à infecção (C57BL/6), quando comparado à linhagem de animais susceptíveis (BALB/c) (CHEN et al., 2001; FRESNO E GIRONES, 2018).

A incompleta eliminação do parasita pode levar a uma reatividade imune que pode resultar em dano tecidual, levando a exposição de novos epítopos e ao estímulo da produção de auto anticorpos (CARROL E SIM, 2011), mecanismo esse envolvido no quadro de autoimunidade presente na doença chagásica (MUNOZ-SARAIVA et al., 2012; DE BONA et al., 2018).

1.6 Proteínas envolvidas na interação entre *T. cruzi* e a célula hospedeira

T. cruzi entra na célula hospedeira por meio da interação entre ligantes existentes na superfície do parasita e na membrana plasmática da célula hospedeira. A remoção de componentes da membrana de macrófagos por enzimas, inibe de forma significativa a interação entre a célula e tripomastigotas sanguíneos ou metacíclicos (NOGUEIRA, COHN, 1976; ALCANTARA,

BRENER, 1980). Da mesma forma, o tratamento de tripomastigotas com tripsina, reduz a capacidade infectante destes em 90% (ANDREWS et al., 1984; COLLI, 1984).

O parasita possui várias glicoproteínas que possuem o motivo GPI (glicosilfosfatidilinositol) adicionados na porção carboxi-terminal durante a modificação pós-traducional. Dentre suas funções, atuam como transdutoras de sinais para adesão celular e infecção de macrófagos, e elas podem ser liberadas da membrana plasmática após clivagem enzimática por fosfolipase C (VILLALTA et al., 1999; GAULTON E PRATT, 1994; ROPERT et al., 2002; EPTING et al., 2010). São diversas proteínas de *T. cruzi* que têm sido caracterizadas em nível estrutural e funcional. Glicoproteínas de superfície com propriedades de adesão celular estão presentes em tripomastigotas metacíclicos, como Gp35/50, Gp30, Gp82 e Gp90 (YOSHIDA, 2006). A Gp35/50 é expressa em epimastigotas, sendo ancorada na membrana plasmática por âncora de GPI (SALTO et al., 2000).

Tripomastigotas metacíclicos com baixa infectividade em células hospedeiras *in vitro*, expressam altos níveis de Gp90, uma molécula que modula negativamente a invasão celular *in vitro* (RUIZ et al., 1998; MÁLAGA, YOSHIDA, 2001). Assim, parasitas com alta infectividade expressam níveis reduzidos de Gp90, enquanto produzem altos níveis de Gp82, ambas ancoradas à membrana plasmática por âncoras de GPI (RUIZ et al., 1998, CARDOSO DE ALMEIDA, HEISE, 1993). A Gp82 é uma glicoproteína envolvida na adesão celular e mobilização de cálcio intracelular (RUIZ et al., 1998), além de estar envolvida na infecção da mucosa após inoculação oral, ligando-se à mucina gástrica presente no epitélio estomacal (NEIRA et al., 2003; CORTEZ et al., 2003).

Proteínas da família rica em serina, alanina e prolina (SAP) são secretadas por tripomastigotas metacíclicos e aderem na superfície de células HeLa, induzindo a entrada de cálcio e promovendo a invasão celular (BAIDA et al., 2006). A Tc-85 é uma glicoproteína de superfície presente em tripomastigotas de cultura de tecido (TCT), e foi relacionada com a invasão celular uma vez que o uso de anticorpos monoclonais contra esta proteína, bloqueia parcialmente a internalização do parasita (ALVES et al., 1986).

A Gp83 é uma glicoproteína de superfície ancorada a GPI usada por TCTs para adesão às células fagocíticas e não fagocíticas durante a invasão celular. Anticorpos anti-Gp83 bloqueiam adesão da proteína quanto a infecção de *T. cruzi in vitro* e *in vivo* (VILLALTA et al., 2001). Essa molécula quando clivada pela fosfolipase C do parasita, se liga à célula hospedeira, ativando vias

de sinalização dependente de proteína quinase C e proteína quinase ativada por mitógenos (VILLALTA et al., 1999) que atuam promovendo a invasão do parasita (NDE et al., 2006).

A cruzipaina é uma cisteína protease de 57/51 kDa ativa em pH 5-7,5, secretada de forma constitutiva e expressa durante todo ciclo biológico do parasita (MURTA et al., 1990; PAIVA et al., 1998). É envolvida na invasão celular e replicação intracelular (MEIRELLES et al., 1992) e sua inibição por peptídeo-fluorometil cetona, resultou em cura da infecção experimental em camundongos (ENGEL et al., 1998). Esta enzima está presente em organelas relacionadas com lisossomos e é associada à membrana plasmática, sendo algumas isoformas liberadas para o espaço extracelular (ALVAREZ et al., 2012; SAN FRANCISCO et al., 2017).

Oligopeptidase B é uma serina hidrolase presente no citosol de *T. cruzi*. A capacidade infectiva de formas TCTs está diretamente relacionada com o nível de expressão desta enzima. Parasitas nocautes para Oligopeptidase B foram incapazes de estabelecer infecção *in vitro* e *in vivo* (BURLEIGH, ANDREWS, 1995; CALER et al., 1998).

São várias as moléculas secretadas ou ligadas à superfície de *T. cruzi*. Aqui citamos alguns exemplos que são envolvidas com adesão à célula hospedeira, invasão e replicação do parasita. O estudo das proteínas envolvidas com a virulência e infectividade de *T. cruzi*, permite que sejam identificados novos alvos para possíveis terapias eficazes e vacinas, que até hoje são inexistentes.

1.7 A proteína P21 de *T. cruzi*

Em 2009, Silva e colaboradores identificaram uma proteína de 21 kDa secretada por *T. cruzi*, a P21, estando a mesma envolvida na invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A P21 é uma proteína ubíqua em *T. cruzi* cuja forma recombinante (rP21), adere à superfície de células HeLa de maneira dose-dependente. A utilização de anticorpos policlonais que se ligam à rP21, inibe a invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos *in vitro*, enquanto a utilização da proteína recombinante juntamente a tais formas do parasita, aumenta a invasão celular em células HeLa (SILVA et al., 2009).

A rP21 aumenta a fagocitose de partículas de zymosan e de diferentes espécies de parasitas intracelulares, por macrófagos peritoneais inflamatórios. Tal aumento é devido à indução da via da PI3-kinase por esta proteína e, conseqüentemente, da polimerização de actina. Vários estudos conduzidos em nosso laboratório indicaram o receptor de quimiocina CXCR4 como receptor da rP21 na célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012b), pois ao se tratar as células com

a quimiocina SDF-1 alfa (ligante do CXCR4), observou-se redução da quantidade de partículas de zymosan fagocitadas por macrófagos peritoneais. Além disso, a rP21 solúvel possui as mesmas características e funções biológicas que a rP21 na sua forma insolúvel (SANTOS et al., 2014).

As diferentes cepas de *T. cruzi*, expressam diferentemente a P21 (FERNANDES, 2013) e o seu tráfego pelas vias endocíticas apresenta pouca co-localização com marcadores de vacúolos tardios em experimentos de cinética de internalização (MARTINS, 2013).

Em experimentos *in vivo* utilizando um modelo de implantação de esponja no dorso dos camundongos (BAILEY et al., 1988; GRINDLAY et al., 1951), diferentes quantidades de rP21 (10µg, 40µg ou 100µg) foram injetadas nos animais a cada 72 horas, durante nove dias. Dentre as análises feitas, foi visto que a quantidade de hemoglobina foi significativamente reduzida no grupo tratado com a proteína recombinante, sugerindo que ela agiria de maneira antiangiogênica, reduzindo a formação de vasos sanguíneos. Além disso, foi verificado o maior recrutamento de células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, as quais por meio da dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosamina (NAG), se mostraram mais ativas nos grupos tratados com a rP21 (TEIXEIRA et al., 2015).

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

Foi avaliado o papel da rP21 na infecção crônica por *T. cruzi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, camundongos BALB/c foram infectados via subcutânea nas patas traseiras, com duas espécies distintas de protozoários intracelulares, pertencentes à mesma família Tripanosomatidae, *L. (L) amazonensis* e *T. cruzi*, e foram analisados os efeitos biológicos causados pelo tratamento com a rP21 após 6 semanas. O tratamento foi realizado a cada 72 horas, também por via subcutânea nas patas traseiras. A análise histopatológica do tecido esplênico, mostrou que os animais infectados e tratados com a rP21 apresentaram aumento dos centros germinativos e edema, com aumento da proliferação linfocítica naqueles com *T. cruzi* (TEIXEIRA, 2018).

Em relação a carga parasitária, houve aumento em cerca de 10 vezes desta em camundongos infectados com *L. (L) amazonensis* e tratados com rP21. Por outro lado, nos camundongos

infectados com *T. cruzi*, a rP21 teve um efeito inverso, diminuindo a carga parasitária. A análise de deposição de colágeno mostrou que a P21 levou ao aumento da área total de fibrose, durante a infecção crônica. Além disso, houve maior recrutamento de macrófagos e linfócitos. A análise do efeito da rP21 no ciclo celular de *T. cruzi*, mostrou que o tratamento com a proteína aumentou o tempo de *T. cruzi* em G1, diminuindo a fase de síntese (S), no entanto, não gerou qualquer efeito no ciclo celular de *L. (L) amazonenses* (TEIXEIRA, 2018).

Sendo assim, propusemos neste trabalho avaliar os efeitos do tratamento da rP21 durante a multiplicação intracelular *in vitro* de *T. cruzi* em modelo de célula muscular murina (mioblastos C2C12), a qual é alvo de *T. cruzi* durante a infecção no hospedeiro vertebrado. Analisamos também os efeitos do tratamento com a proteína recombinante durante a infecção aguda experimental com a cepa Y de *T. cruzi* em camundongos BALB/c.

2. Justificativa

A DC afeta milhares de pessoas, em especial aquelas residentes em países subdesenvolvidos. É considerada uma das doenças negligenciadas pela OMS, uma vez que não desperta interesse econômico de indústrias farmacêuticas para desenvolvimento de novas terapias mais eficazes.

No decorrer da DC no hospedeiro vertebrado, vários órgãos sofrem danos, seja pela ação do parasita quanto pela resposta imunológica do indivíduo. No entanto, o estudo de proteínas secretadas por *T. cruzi* durante as diferentes fases do ciclo de vida, permite que se compreenda melhor a resposta do hospedeiro frente a fatores secretados pelo parasita. Nosso grupo de pesquisa caracterizou uma proteína, a P21, exclusiva de *T. cruzi* e secretada por todas as formas evolutivas. Desde então, diferentes estudos têm sido feitos para desvendar suas funções e aplicabilidades de sua forma recombinante, a rP21 (SILVA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012b; SANTOS et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017).

Acreditamos que a proteína P21 participe da evasão do parasita à resposta imune e contribui para o sucesso da cronificação da DC. Com a utilização da proteína recombinante, vimos que a proteína possui atividade pró-fagocítica, induz a polimerização do citoesqueleto actina em vários modelos celulares, se liga ao receptor de quimiocina CXCR4, ativando a via PI3-kinase (RODRIGUES et al., 2012b). Uma maior polimerização do citoesqueleto de actina pode estar relacionada com a transição da fase aguda para a fase crônica da DC, onde o parasita ficaria

confinado dentro da célula hospedeira, por meio da barreira física criada pela maior quantidade de filamentos de actina polimerizados. Além disso, a rP21 induz em modelos livres de infecção, a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, aumentando a taxa de inflamação local.

Tendo em vista todas as atividades biológicas apresentadas pela proteína recombinante P21 de *T. cruzi*, torna-se importante aprofundar os estudos das demais atividades desta proteína, no decorrer da infecção por *T. cruzi*. Neste estudo, realizamos diversos ensaios para determinação do papel da rP21 frente a multiplicação intracelular de *T. cruzi* das cepas G e Y. Além disso, verificamos se a indução da polimerização de F-actina se aplica ao modelo de célula muscular, aquela frequentemente alvo do parasita no hospedeiro vertebrado. Determinamos o padrão de citocinas e de óxido nítrico produzido *in vitro*. Realizamos também experimentos de infecção aguda experimental, onde analisamos diversos parâmetros e efeitos do tratamento com rP21. Assim, por meio do presente estudo, pretendemos contribuir para compreensão do papel rP21 na relação parasito – hospedeiro, utilizando modelos de infecção por *T. cruzi in vitro* e *in vivo*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar o papel da rP21 na replicação intracelular de *T. cruzi in vitro* e seu papel durante a infecção experimental aguda pela cepa Y em camundongos BALB/c.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar o papel da rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina de mioblastos C2C12;
- 2- Analisar o efeito do tratamento com rP21 sobre a replicação intracelular das cepas G e Y de *Trypanosoma cruzi* em mioblastos C2C12;
- 3- Avaliar a produção de óxido nítrico, IFN- γ , IL-10, IL-4 e TNF- α por células infectadas com *T. cruzi* e tratadas ou não com rP21;
- 4- Analisar o efeito da rP21 sob a viabilidade de amastigotas intracelulares da cepa Y;
- 5- Estudar o efeito do tratamento com rP21 durante a infecção experimental aguda em camundongos BALB/c, com inóculos de 10^6 e 10^5 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

- 5.1- Verificar a ação da rP21 sobre a cinética de parasitemia sanguínea ao longo de 21 dias de infecção;
 - 5.2- Analisar a carga parasitária no tecido cardíaco de animais submetidos ou não ao tratamento com a proteína recombinante;
 - 5.3- Avaliar alterações morfológicas no tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Y e tratados ou não com a rP21;
 - 5.4- Analisar angiogênese, deposição de colágeno total e colágeno tipo I e tipo III, recrutamento de mastócitos e infiltrado inflamatório, em animais tratados ou não com a rP21;
 - 5.5- Quantificar os níveis das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e TNF- α no soro, coração e baço;
 - 5.6- Quantificar marcação para P21 nativa e para *T. cruzi* em ninhos cardíacos de amastigotas;
- 6- Avaliar os níveis transcricionais e a produção da P21 nativa, por amastigotas e epimastigotas submetidos ao estresse por ativação celular e nutricional, respectivamente;

4. Material e Métodos

4.1 Cultura de células

Foram utilizadas células Vero para manutenção do ciclo de *T. cruzi in vitro* e mioblastos C2C12. Ambas as células foram obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para cultivo das mesmas, se utilizou meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* - DMEM (Vitrocell/Embriolife), com L-glutamina (2mM) e D-glicose (4.500 mg/L), bicarbonato de sódio (2.000 mg/L), HEPES (2.380 mg/L), piruvato de sódio (1.100 mg/L), suplementado com os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L), e com 10% de soro fetal bovino – SFB (Vitrocell/Embriolife). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.2 Cultura de parasitos

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

4.3 Animais

Camundongos machos BALB/c, de seis a oito semanas de idade foram mantidos em condições padrões de temperatura (25 ± 2 °C) e iluminação (ciclo alternando 12 horas com luz- 12 horas em ausência de luz), com alimento e água *ad libitum*. Os animais foram fornecidos e mantidos no Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU). A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com os fundamentos internacionais de bem-estar animal, conforme a Resolução Normativa nº 37 de 15/02/2018, que estabelece as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O projeto foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA) e obteve a aprovação com registro de nº 087/15 (Anexo I).

4.4 Purificação da rP21

Para produção da proteína P21 recombinante foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 transfectadas com o plasmídeo pET-28^a(+) (Novagem) apresentando o gene que codifica a rP21 (GenBank: EU004210.1). Em um pré-inóculo, as bactérias foram colocadas em meio Luria-Bertani (LB) com o antibiótico de seleção Kanamicina (50µg/mL). O pré-inóculo foi mantido sob agitação por 18h a 37°C. Posteriormente, o pré-inóculo foi diluído 1:50 no mesmo meio e incubado a 37°C, com agitação a 150 RPM, até atingir a densidade óptica (OD) de 0,6 a 0,9. Em seguida, se adicionou 1mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), a fim de estimular a expressão da proteína recombinante. Após 3h de incubação, centrifugou-se o meio contendo as bactérias a 10.000 x g por 20 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em PBS 1x.

Para promover a lise bacteriana foi acrescentado ao material ressuspendido 10 µL de lisozima (50mg/mL) a cada 10 mL de solução por 20 min. Em seguida, foi utilizado o Sonicador

Branson Sonifier 450, durante 20 ciclos de um minuto com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado bacteriano foi centrifugado a $20.200 \times g$ por 20 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em solução tampão de ureia 6M. A amostra foi incubada com uma resina de níquel e deixada *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), contendo concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M, respectivamente). O imidazol é um composto que se liga à coluna de níquel, competindo desse modo com a cauda de histidina presente na rP21 que também possui afinidade por níquel, resultando na liberação da proteína recombinante purificada.

O material eluído foi dialisado em PBS 1x com uma membrana de diálise com microporos que permitem a passagem de moléculas de até 3,5 kDa (Spectra/Por 131198). A dialise foi realizada por 48 h, sob agitação contínua a 4°C , para a separação da proteína dos resíduos de contaminantes acumulados durante o processo de purificação, incluindo a ureia, permitindo assim o renovelamento proteico. A solução de PBS 1x foi reposta após o primeiro dia de diálise. A concentração da amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando-se a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). A pureza da rP21 eluída foi verificada por meio de gel SDS-PAGE 13% (LAEMMLI, 1970) com coloração de Coomassie Blue. O protocolo de purificação da rP21 (GenBank: EU004210.1) foi realizado de acordo com o descrito por Silva et al., (2009) e Santos et al., (2014).

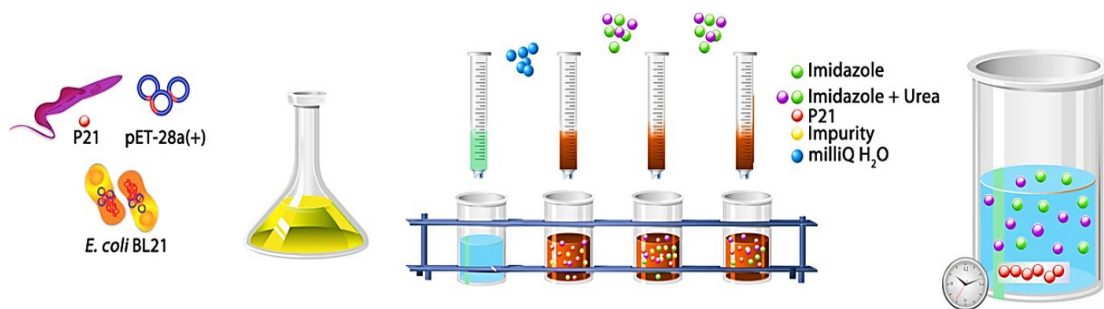


Figura 3. Resumo do processo de purificação da proteína P21 recombinante. A obtenção da proteína ocorre a partir da inserção de clones do gene da P21 em bactérias *E. coli*. É realizado o crescimento em meio LB, seguido de lise bacteriana. O lisado total é incubado com coluna de níquel. Em seguida, se faz lavagens com concentrações crescentes de imidazol, até que a rP21 seja eluída. O material eluído é dialisado

em PBS para eliminação de resíduos de ureia e outros contaminantes durante 48 horas (SANTOS, et al., 2014).

4.4 Análise da polimerização do citoesqueleto de actina por microscopia confocal

Mioblastos C2C12 foram semeados em microplacas de 24 poços, contendo lamínulas circulares de 13mm, na quantidade de 2×10^4 células/poço. Após a adesão celular, as células foram tratadas ou não com rP21 (40 μ g/mL), conforme padronizado por Rodrigues et al., 2012b. Após 96 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas em formaldeído 4%. Os filamentos de actina das células foram marcados na cor vermelha com Faloidina (*Fluorescein isothiocyanate labeled TRITC-phalloidin* Sigma Aldrich: P5282) diluída 1:1000 em PBS+saponina (0,01%).

Após lavagens com PBS, as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente *anti-fading*). As imagens foram adquiridas em aumento de 63x, através de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagens. As imagens foram analisadas quanto à fluorescência pelo *software* Image J (National Institutes of Health, USA). Para esta análise, selecionamos a região ocupada pela célula utilizando a ferramenta apropriada e configuramos na opção ‘*Analyze*’ – ‘*Set measurements*’, para ser mensurados os valores de ‘*mean grey value*’. Em seguida, selecionou-se a opção ‘*Analyze – measure*’, sendo os valores resultantes disponibilizados em uma tabela. Os valores da ‘*mean grey value*’ de cada célula, foram deduzidos daquele obtido para a região existente na periferia da célula, para excluir o ‘*background*’, e os valores obtidos foram considerados unidades arbitrárias (UA) para medida da intensidade de fluorescência obtida pela marcação de actina.

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

Mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de seis poços na quantidade de 1×10^5 células/poço. Tais células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ e deixadas *overnight* para aderirem. No outro dia, o meio foi repostado contendo ou não a proteína rP21(40 μ g/ml), sendo posteriormente incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 96h de tratamento, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e as células foram pré-fixadas com solução de formaldeído a 2%. Em seguida, as células foram desaderidas com a utilização de *cell scraper*,

fixadas em formaldeído 4% por uma hora, lavadas com PBS e colocadas em solução de PBS + Gelatina 0,25% + Azida Sódica 0,1% (PGN) por 3 horas. Para marcação dos filamentos de actina, as células foram incubadas com Faloidina (*Fluorescein isothiocyanate labeled TRITC-phalloidin* Sigma Aldrich: P5282) diluída 1:1000 em PBS+saponina (0,01%). As células em suspensão ficaram incubadas com a solução supracitada em câmara escura por uma hora, sendo posteriormente centrifugadas e lavadas com PBS. Após a última lavagem, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200µl de PBS, sendo a amostra depositada em tubos de ensaio de fundo redondo para análise no citômetro Guava easyCyte, Guava Technologies, Millipore. Os resultados da citometria foram analisados pelo programa Guava® Suite *Software* 2.7.

4.6 Ensaio de multiplicação *in vitro*

Mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de 24 poços (10^5 células/poço), contendo lamínulas de 13 mm, e incubados *overnight* para aderência a 37°C e 5% de CO₂. No outro dia, as células foram infectadas com tripomastigotas de cultura de tecido das cepas G ou Y de *T. cruzi* (TCT G ou TCT Y; 10 parasitas por célula), por 3 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitas não internalizados, seguido de incubação com meio de cultura contendo ou não rP21 (40µg/ml), sendo repostado após 48 horas. As células foram fixadas após 96 horas, em solução de formaldeído 4% e incubadas com anticorpo policlonal anti - *T. cruzi*, diluído 1:200 (v/v) em solução de PGN+ saponina. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário IgG *anti-rabbit* feito em cabra Alexa Fluor 488, diluído 1:200 em PGN+saponina, contendo também Faloidina (*Fluorescein isothiocyanate labeled TRITC-phalloidin* Sigma Aldrich: P5282) na diluição de 1:1000.

Após lavagens com PBS, as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente *anti-fading*). As imagens foram adquiridas em aumento de 63x, através de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagens. Quantificou-se o número de parasitas em 100 células infectadas em campos aleatórios da lamínula.

4.7 Análise por citometria de fluxo da multiplicação parasitária

Células C2C12 foram plaqueadas em placas de 6 poços (10^6 células/poço) e incubadas a 37°C/5% CO₂ *overnight*. No outro dia, as células foram infectadas com tripomastigotas da cepa Y,

fixadas e imunomarcadas como descrito no item 4.6. A quantificação da infecção e da polimerização do citoesqueleto de actina foi feita por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas no citômetro FACSCanto II Becton, Dickinson, and Company – BD, Franklin Lakes, NJ, USA. Foram adquiridos pelo menos 50.000 eventos por amostra, e os resultados foram obtidos se utilizando o *software* FlowJo X (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

4.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)

O sobrenadante de mioblastos C2C12 infectados com a cepa G ou Y por 96 horas, e tratados com rP21 foram armazenados a -70°C para dosagem de óxido nítrico. Como controle positivo de ativação celular, foi utilizada a citocina IFN- γ recombinante, na concentração de 10ng/ml. Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (GREEN et al.,1982), que consiste na detecção de nitrito (NO^{2-}), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se a uma placa de 96 poços, 50 μl do sobrenadante de cultura em triplicata, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 2,5% (solução A) e de N-1-naphtylethtylenodiamina, também diluído em solução de H_3PO_4 a 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μM passou por diluições seriadas (fator 2) em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 450 nm. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão, e os resultados obtidos expressos como a média da triplicata \pm desvio padrão.

4.9 Dosagem de citocinas do sobrenadante de células infectadas com *T. cruzi*

O sobrenadante de células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* e submetidos aos tratamentos com IFN- γ e rP21, conforme descrito no item 4.6, foi armazenado em freezer a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 foram mensurados com a utilização do BD OptEIA™ ELISA *kit*, seguindo-se todas recomendações fornecidas pelo fabricante.

4.10 Análise da viabilidade de amastigotas intracelulares

Mioblastos C2C12 foram plaqueados, infectados com TCTY e tratados conforme descrito no item 4.6. Após 96h, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e as células desaderidas com a utilização de *cell scraper*. Para lise das células e recuperação dos amastigotas intracelulares,

foram utilizadas seringas de insulina, acopladas a agulhas de 4,0 mm de comprimento x 0,23 mm de largura. Os amastigotas recuperados foram analisados quanto sua viabilidade e capacidade de se diferenciar em epimastigotas por meio da incubação em meio LIT pH 7,2 por 10 dias. Após esse tempo, os parasitas foram contabilizados em câmara de Neubauer, sendo expresso graficamente o n° de epimastigotas x 10⁴.

4.11 Infecção experimental

Camundongos BALB/c, machos de 6 a 8 semanas de idade, foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, contendo 10 animais cada: Grupo 1 (G1) -Controle não infectado e tratado com PBS; G2 - Controle não infectado e tratado com rP21; G3 - Infectado com 10⁶ tripomastigotas de *T. cruzi* e tratado com PBS; G4 - Infectado com 10⁶ tripomastigotas e tratado com rP21; G5 - Infectado com 10⁵ tripomastigotas e tratado com PBS; e G6 - Infectado com 10⁵ tripomastigotas e tratado com rP21.

Os animais foram inoculados na região subcutânea com 10⁶ ou 10⁵ tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. O tratamento com PBS ou rP21 foi administrado no mesmo local de infecção no momento da inoculação com o parasita, e repetido no 5° e 15° dias pós-infecção (dpi). O tratamento com rP21 foi realizado na quantidade de 100µg por animal, diluída em 200µL de PBS 1x. Os grupos que receberam o tratamento com PBS, receberam 200 µL do tampão fosfato também em região subcutânea. A partir do 5° dia de infecção, foi realizada parasitemia por contagem do número de tripomastigotas sanguíneos em 5µl de sangue fresco retirado da veia caudal, sendo repetida a cada 2 dias. No 21° pós-infecção, os animais foram eutanasiados sob anestesia. Sangue, coração e baço foram coletados para análises histológicas, imunológicas e moleculares.

4.12 Análises histológicas

Amostras de coração foram fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10% com fosfato de sódio monobásico e dibásico, desidratado em solução de etanol, diafanizado em xilol e embebido em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos de coração foram seccionados em cortes de 5 µm de espessura e colocados sobre lâminas para diferentes tipos de coloração.

4.12.1 Análise de infiltrado inflamatório, ninhos de amastigotas e angiogênese

A fim de avaliar o número de ninhos de amastigotas, vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e nível de dano tecidual, lâminas contendo tecido cardíaco foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). O número de ninhos de amastigotas e vasos sanguíneos foram quantificados por microscopia de luz, normalizado e demonstrado graficamente como vasos sanguíneos ou ninhos de amastigotas/mm² de tecido cardíaco. O infiltrado inflamatório e dano tecidual foi demonstrado qualitativamente por escore de intensidade: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso, conforme descrito por Silva et al., (2018).

4.12.2 Quantificação de colágeno

Lâminas contendo cortes de 5µm foram coradas com solução de Picrossirius Red (Sigma Aldrich), sendo posteriormente contracoradas com solução de hematoxilina e eosina. Após desidratação em etanol e diafanização em xilol, as lâminas foram montadas utilizando Entellan®. A quantificação das fibras colágenas totais foi realizada se utilizando o *software* Image J, de 20 imagens obtidas de cada amostra em microscópio de luz acoplado a câmera Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, HE, Alemanha), no aumento de 20x, totalizando 200 imagens / grupo,

Para quantificação do colágeno tipo I e III, se utilizou microscópio invertido de fluorescência *Nikon Eclipse TiS* com luz polarizada acoplada ao analisador de imagem digital. Nesse microscópio, a coloração com Picrossirius Red marca as fibras colágenas tipo I com cor vermelha e as fibras colágenas tipo III com coloração verde. A sobreposição de ambas gera cor amarela – alaranjada (JUNQUEIRA et al., 1979). Foram obtidas 20 fotomicrografias de campos aleatórios com a objetiva no aumento de 20x, totalizando 200 fotomicrografias por grupo. Foram excluídas áreas de inserção de grandes vasos e de tecido conjuntivo de revestimento do coração, pois estas concentram maior quantidade de colágeno, o que poderia influenciar na análise do resultado.

Para análise das fotomicrografias, se utilizou o *software ImageJ*, por meio do qual foi mensurada a % (porcentagem) de colágeno tipo I e tipo III em cada imagem. Foi realizada a calibração do *software* utilizando uma imagem disponibilizada em <https://ImageJ.nih.gov/ij/download.html>, para esse fim. Realizou-se análises individuais do colágeno tipo I e tipo III, por meio da opção *Split Channel* e configuração de *Threshold*, onde todas

imagens foram ajustadas para captação da mesma faixa de coloração. A porcentagem de cada tipo de colágeno por imagem foi tabelada para análise no GraphPad Prism 6.01.

4.12.3 Quantificação de mastócitos

Para contagem do número de células recrutadas no tecido cardíaco, lâminas contendo cortes de coração foram coradas com azul de toluidina. Em resumo, as lâminas após serem hidratadas foram colocadas em tampão fosfato-citrato de pH 3,0 por 5 minutos e coradas com azul de toluidina 0,5% por 3 minutos. O excesso de corante foi removido por imersão dos cortes no tampão e, após clarificação em concentrações crescentes de etanol e xilol, as lâminas foram montadas se utilizando Entellan®. O número de mastócitos totais, granulados e degranulados foi graficamente expresso dividindo-se por área (mm²) analisada do tecido.

4.13 Quantificação de carga parasitária por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A fração do tecido cardíaco de cada animal separada para realização em PCR, teve sua massa mensurada e o DNA extraído utilizando o *PureLink Genomic Dna Kit* (K1820-01, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as amostras foram digeridas com *PureLink Genomic digestion buffer* e proteinase K a 55°C *overnight*. Em seguida, se acrescentou RNase, *PureLink Genomic lysis/ binding buffer* e etanol PA. O lisado obtido foi colocado em *PureLink spin column*, lavados e eluídos, com tampões específicos. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-vis).

As reações de qPCR foram preparadas utilizando-se o *primer* P21 fw (5'-AACGCCACCATCAATCTTTTG-3') e P21 rv (5'-CGTCGCATTTCCTCATTTCTTC-3'), os quais resultam na amplificação de fragmento de antígeno de *T. cruzi* (65bp), como descrito por Brigido et al., 2016. Para quantificação da carga parasitária, uma curva padrão com diluições de 1:10 de DNA de 10⁸ parasitos/mL de *T. cruzi* homogeneizado em tecido cardíaco não infectado (25mg), foi previamente preparada.

Para a reação de qPCR, 25ng de amostras de DNA, quelante de DNA Power SYBR Green PCR Master Mix reagente (Applied Biosystems) e 10µM de cada *primer* foram utilizados. As reações foram processadas em aparelho termociclador ABI7300 (Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15

segundos e 60°C por 60 segundos (BRIGIDO et al., 2016). Após a elongação final do qPCR, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50°C para 95°C, com aumento gradual de 0,5 °C/ segundo para obter a temperatura de *melting* e evitar produtos inespecíficos.

4.14 Dosagem dos níveis de citocinas no tecido cardíaco, esplênico e soro

Para dosagem dos níveis de citocinas do tecido cardíaco e esplênico, fragmentos dos órgãos macerados foram imersos em solução de PBS contendo *protease inhibitor cocktail* (1 comprimido diluído em 50 mL de PBS -Complete, Sigma Aldrich). Após homogeneização em homogeneizador de tecidos, a quantificação do total de proteínas e citocinas foi realizada. Os níveis séricos de diferentes citocinas foram mensurados, a partir do sobrenadante de amostras de sangue centrifugadas colhidas dos camundongos infectados ou não. O sobrenadante de células infectadas por 96 horas, foi também utilizado para quantificação de citocinas. Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 foram mensurados com a utilização do BD OptEIA™ ELISA *kit*, seguindo-se todas recomendações fornecidas pelo fabricante.

4.15 Reação de imunofluorescência indireta

Lâminas contendo cortes histológicos foram utilizadas para reação de imunofluorescência indireta. Primeiramente, a parafina dos cortes foi removida com imersão em xilol e álcool, em seguida, as lâminas foram tratadas com cloreto de amônia 50mM por uma hora. Seguiu-se de bloqueio antigênico para evitar marcação inespecífica com BSA a 4% (Albumina de Soro Bovino) por 1 hora, seguido da incubação com o reagente *Background sniper*, por também 1 hora.

Após lavagens em PBS 1x, as lâminas foram incubadas *overnight* com anticorpo policlonal de coelho anti-rP21 e anticorpo policlonal anti-*T. cruzi* feito em camundongo, diluídos ambos em PGN-saponina na proporção de 1:100. Se utilizou como anticorpo secundário, IgG anti-*rabbit* Alexa Fluor® 488 (cor verde) (Thermo Fisher Scientific, USA) e IgG - TRITC anti-*mouse* feito em rato (cor vermelha), ambos na diluição de 1:200 em solução de PGN-saponina.

Após lavagens com PBS, as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilendiamina (PPD, agente *anti-fading*). As imagens foram adquiridas por meio do microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagens.

4.16 Avaliação da produção de P21 nativa por amastigotas intracelulares e epimastigotas submetidos a diferentes tipos de estresses

Para simular condições de estresses em que diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* são submetidos durante seu ciclo biológico, mioblastos C2C12 contendo amastigotas intracelulares foram tratados ou não com IFN- γ (10ng/ml) por 96 horas, enquanto formas epimastigotas foram incubadas em meio LIT pH 7,2 contendo ou não soro fetal bovino, por 48 horas. Após o tempo de incubação descrito anteriormente para cada situação, as amostras foram armazenadas em RiboZol, para posterior extração de RNA ou foram lisadas e armazenadas para realização de ELISA, conforme descrito em detalhes a seguir.

4.16.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a extração de RNA, foi utilizado o *RiboZol™ Plus RNA Purification Kit* (Amresco), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações assim como a qualidade do RNA extraído foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Scientific) e somente as amostras com pureza ideal (2.0 ± 0.1) foram selecionadas.

Para síntese de DNA complementar foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizou-se 5 μ g de RNA em um volume de 13 μ L e a reação foi realizada em um termociclador (Techne® Endurance TC-312, UK). O protocolo iniciou-se em uma temperatura de 50°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.

4.16.2 Quantificação dos níveis transcricionais relativos de P21 por RT-qPCR em tempo real

A quantificação gênica relativa foi determinada na plataforma ABI 7300 (Applied Biosystems) e os dados recebidos foram processados usando o *software* v1.4.1 SDS (Applied Biosystems). Se analisou os níveis transcricionais da P21 por meio do par de iniciadores P21fw (5'-AACGCCACC ATCAATCTTTTG -3'), P21rv (5'-CGTCGCATTCCTCATTCTTC-3'), que resulta na amplificação de fragmento de 65 pares de base *T. cruzi*. Como gene controle da reação, se utilizou o D71/D72 (fw 5'- AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3' e rv 5'-

TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'), o qual amplifica um fragmento de 105 ou 123 pb de RNAr 24S α D71/D72 (SOUTO; ZINGALES, 1993).

Cada reação continha 6,25 μ L de SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 0,4 μ M de cada iniciador, e 50 ng de cDNA (volume total da reação de 13 μ L). Foram usadas condições de ciclização padrão, tal como recomendado pelo fabricante: 95°C durante 10 min, (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) x 40 ciclos, e a análise da temperatura de *melting* a 95°C durante 15 segundos, em seguida 60°C durante 1 min.

Cada reação de PCR foi realizada em triplicada, e controles sem cDNA foram incluídos. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Além disso, a análise da temperatura de *melting* foi realizada em cada ensaio, a fim de detectar a ampliações inespecíficas. Os níveis relativos de expressão gênica foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ animais infectados (Ct do gene alvo - Ct gene controle da reação - ΔCt animais de não infectados (Ct de gene alvo - Ct do gene controle da reação)). Os valores extremos não foram incluídos na análise estatística.

4.16.3 Ensaio de ELISA para detecção de P21 nativa

Foi realizado ensaio de ELISA, do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*, para detecção de P21 nativa no extrato de células infectadas e de epimastigotas. Para isso, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 50 μ L de extrato bruto obtido por lise em tampão RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer* – Sigma Aldrich), anteriormente dosados e normalizados para 50 μ g/mL de proteínas totais em tampão carbonato – bicarbonato a 0,06 M e pH 9,6.

Após lavagens em PBS – Tween 0,05%, se adicionou anticorpo policlonal anti-P21 feito em coelho na diluição de 1:200 nos poços, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Em sequência, a placa foi incubada com anticorpo secundário anti-*rabbit* IgG conjugado com HRP (A0545 Sigma Aldrich) por 1 hora a 37° C. A reação foi revelada com adição do substrato enzimático H₂O₂ 0,03% e O-Fenilenodiamina em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0, com interrupção pela adição de H₂SO₄ a 2N. A densidade óptica (OD) foi determinada a 492nm. A proteína recombinante P21 foi utilizada para construção de curva padrão com concentração inicial de 200 μ g/mL seguindo de diluição seriada.

4.17 Análise estatística

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

4.18 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos envolvendo manuseio de amostras biológicas e reagentes, bem como a utilização de equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

5. Resultados e Discussão

5.1 rP21 aumenta a polimerização do citoesqueleto de actina em células C2C12 e diminui a multiplicação de *T. cruzi in vitro*

A rP21 liga-se ao receptor CXCR4 e promove a ativação da via de sinalização PI3-quinase, resultando no remodelamento do citoesqueleto de actina em macrófagos peritoneais (RODRIGUES et al., 2012b). Para determinar se a rP21 teria ação no citoesqueleto de actina em células musculares, tratamos mioblastos murinos C2C12 com a proteína recombinante por 96 horas a 40 $\mu\text{g/ml}$. Conforme podemos observar na **Figura 4-A**, a análise por microscopia confocal de células C2C12 marcadas com faloidina-TRITC, mostra que o tratamento com a rP21 aumentou a polimerização do citoesqueleto de actina, resultado esse confirmado pela citometria de fluxo realizada com as células nas mesmas condições (**Figura 4-B**). Teixeira et al., (2017) observou efeito semelhante em linhagens de células endoteliais murinas (células T-end), sugerindo que o papel da rP21 na polimerização do citoesqueleto de actina se estende a vários tipos celulares.

A capacidade da rP21 de induzir fagocitose inespecífica foi previamente descrita por Rodrigues et al., (2012b), onde macrófagos peritoneais incubados com partículas de zymosan, tratadas com diferentes concentrações de rP21, apresentaram maior número de partículas

internalizadas que o grupo controle não tratado. No entanto, o efeito da rP21 na replicação intracelular do parasita ainda era desconhecido.

Aqui utilizamos duas cepas representativas dos dois maiores grupos genéticos de *T. cruzi*, a cepa G, que pertence a TcI e a cepa Y, pertencente a TcII. A cepa G possui baixa infectividade *in vivo*, enquanto a Y é altamente virulenta (MAGALHÃES et al., 2015). Assim, infectamos células C2C12 com tripomastigotas de cultura de tecido das cepas G e Y e realizamos o tratamento com rP21, por 96 horas. Como mostrado nas **Figuras 4-C e 4-D**, as células C2C12 infectadas e tratadas com rP21 apresentaram número reduzido de parasitas intracelulares, quando infectadas tanto com a cepa Y quanto G, o que mostrou que o efeito em conter a replicação de *T. cruzi* não se restringe à um grupo genético ou cepa específica.

Realizamos também citometria de fluxo de mioblastos C2C12 infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, onde vimos que o tratamento com rP21 levou à reduzida marcação para o parasita (FITC) com concomitante aumento da fluorescência de F-actina (TRITC) (**Figura 4-E**). Esses achados nos levam a propor que a maior polimerização do citoesqueleto de actina induzida pelo tratamento com rP21 poderia formar uma barreira física intracelular, a qual dificultaria a replicação de *T. cruzi*.

A importância do citoesqueleto de actina durante a replicação do parasita já foi demonstrada anteriormente por outros autores (WOOLSEY AND BURLEIGH, 2004; MOTT et al., 2009; ARAÚJO et al., 2016). Durante a polimerização do citoesqueleto de actina, a proteína 1 tipo 1 associada a filamentos de actina (AFAP-1L1) da família AFAP interage com cortactina e está localizada em locais de polimerização dinâmica de actina. A mesma pode ser ativada por estímulos externos para promover rearranjos do citoesqueleto (SNYDER et al., 2011). Foi visto que células nocautes para AFAP-1L1, as quais apresentaram menor polimerização de actina, possuíram maior taxa de replicação intracelular de *T. cruzi* da cepa Y. Ou seja, uma diminuição da polimerização do citoesqueleto de actina leva à um ambiente livre de barreiras para multiplicação parasitária (ARAÚJO et al., 2016). Outros autores relataram que um citoesqueleto mais rígido, retém o parasita dentro da célula hospedeira (WOOLSEY AND BURLEIGH, 2004), enquanto que o seu desarranjo, seria mais propício para a livre replicação intracelular de *T. cruzi* (MOTT et al., 2009).

Dessa forma, a P21 de *T. cruzi* ao induzir a polimerização do citoesqueleto de actina, facilita a entrada do parasita na célula no momento da invasão e em seguida ajuda em seu confinamento

no ambiente intracelular. Tal confinamento protege o protozoário do ataque do sistema imunológico do hospedeiro, resultando na sua permanência e sobrevivência no organismo infectado.

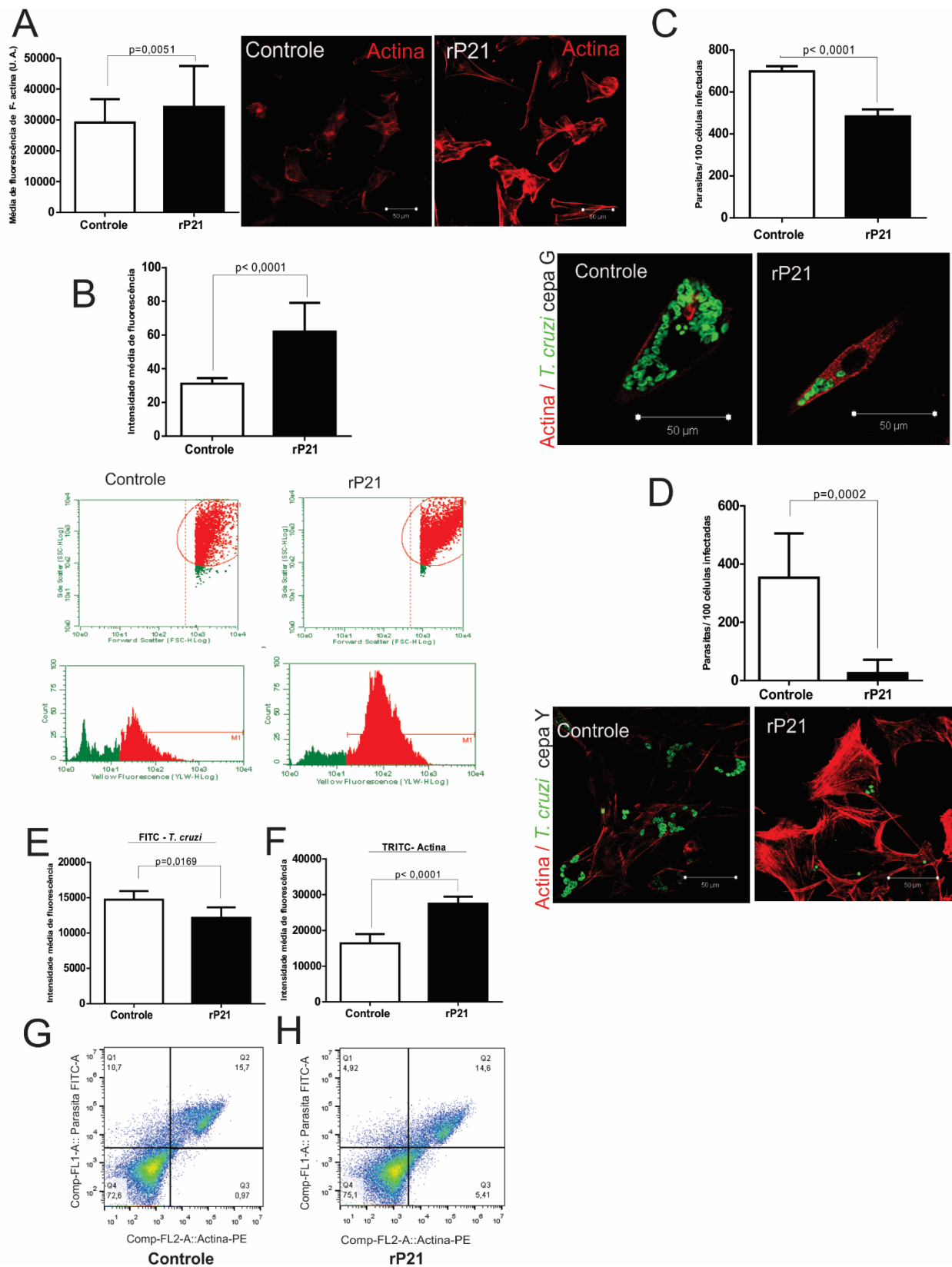


Figura 4. A rP21 aumenta a polimerização do citoesqueleto de actina em mioblastos C2C12 e diminui a replicação intracelular de *T. cruzi*. **A.** Células C2C12 foram incubadas por 96 horas com rP21 e posteriormente a actina foi marcada com Faloidina – TRITC (vermelho). Observamos que o tratamento com rP21 aumentou a polimerização do citoesqueleto de actina. Imagens representativas da marcação para F-actina do grupo controle e tratado com rP21 são mostradas. **B.** Citometria de fluxo de mioblastos C2C12 tratados ou não rP21, confirmaram o aumento da polimerização de citoesqueleto de actina. **C e D.** Células foram infectadas com TCTG (**C**) ou TCTY (**D**) e, posteriormente tratadas ou não com rP21. A proteína recombinante diminuiu a multiplicação *in vitro* de ambas as cepas. Parasitos foram marcados com anticorpo FITC- conjugado (verde) e F-actina com faloidina-TRITC (vermelho). Imagens representativas são mostradas. **E.** Análise por citometria de fluxo de células infectadas com a cepa Y mostra menor marcação para *T. cruzi* quando realizado o tratamento com rP21, enquanto apresenta maior marcação para (**F**) actina. **G.** Representação da distribuição das células em análise por citometria de fluxo da dupla marcação para *T. cruzi* e actina no grupo controle e (**H**) no grupo tratado com rP21. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) dos experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o teste t Student (two-sided) (A, B, C, D, E, F). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Além da barreira física citoplasmática constituída de actina filamentosa (F-actina), outros mecanismos desencadeados pela rP21 poderiam afetar potencialmente a multiplicação do parasita. Assim, testamos se a rP21 possui efeito em induzir a produção de moléculas inflamatórias que levariam a morte ou diminuição da viabilidade de *T. cruzi* dentro da célula. Utilizamos como controle de ativação celular pró-inflamatória, a citocina recombinante IFN- γ na concentração de 10ng/ml, previamente padronizado por MARTINS, 2015. A análise da produção de óxido nítrico (NO) mostrou que o tratamento com IFN- γ e rP21 aumentou os níveis de óxido nítrico liberados por células infectadas com *T. cruzi* (**Figura 5-A**). Realizamos também dosagens de diferentes citocinas no sobrenadante de células infectadas com a cepa Y, a mesma que utilizamos na infecção experimental aguda descrita posteriormente, e observamos que o tratamento de células C2C12 infectadas com cepa Y com rP21 aumentou a produção de IFN- γ (**Figura 5-B**) e IL-4 (**Figura 5-C**), enquanto diminuiu a produção de IL-10 em comparação com as células não tratadas (controle) (**Figura 5-E**). Enquanto isso, não foram observadas diferenças para os níveis de TNF- α produzidos pelas células infectadas e submetidas aos diferentes tratamentos (**Figura 5-D**).

Observamos que as células tratadas com rP21, apresentaram maior produção de NO e IFN- γ . Sabe-se que a citocina (IFN- γ) induz a transcrição do gene codificador da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que aumenta a produção de óxido nítrico (MACCABE et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992). A importância de ambas moléculas durante a infecção por *T. cruzi* é vista pela administração de IFN- γ à camundongos na fase aguda, o que resulta em diminuição da parasitemia

e mortalidade dos animais (REED, 1998). Enquanto isso, o tratamento com inibidores de óxido nítrico resulta em aumento da parasitemia e da taxa de mortalidade dos camundongos infectados (VESPA et al., 1994; PETRAY et al., 1995). Em relação ao aumento de IL-4 induzido por rP21, tal resultado corrobora com o visto em modelos de implantes de esponja *in vivo* desprovidos de infecção (TEIXEIRA et al., 2015).

A ativação da citocina IFN- γ , juntamente o aumento da produção de óxido nítrico, poderia resultar na morte do parasita intracelular. Para analisar se a viabilidade dos amastigotas intracelulares era alterada pelos tratamentos supracitados (IFN- γ e rP21), fizemos a recuperação destes parasitas por lise celular. Tais amastigotas foram deixados em meio de cultura LIT pH 7,2 para sua diferenciação em epimastigotas e posterior replicação. Avaliamos, depois de 10 dias, a quantidade de epimastigotas diferenciados e provenientes de cada situação. Como podemos ver na **Figura 5-F**, o tratamento com rP21 não gerou qualquer efeito na viabilidade do amastigota em se diferenciar em epimastigota, ao contrário do tratamento com IFN- γ , que reduziu a diferenciação e replicação de epimastigotas.

A resposta imunológica de perfil Th1 é caracterizada pela produção de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ por macrófagos, neutrófilos e linfócitos, estando diretamente envolvida com a imunidade contra parasitos intracelulares (ex: *T. cruzi*). Enquanto isso, o fenótipo Th2 é caracterizado pela secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, o qual confere imunidade principalmente contra parasitos extracelulares, como helmintos. Vários autores indicam que a persistência do parasita está relacionada com o balanço entre o fenótipo Th1 e Th2 (BERN et al., 2011; SAMUDI et al., 1998; DE MORAIS et al., 2015). Um exemplo disso deu-se em estudo onde realizou-se a análise de células polimorfonucleares em crianças com DC assintomática na fase crônica, as quais apresentaram altos níveis de mRNA de IL-4, sugerindo que o balanceamento entre as respostas do tipo Th1 e Th2 suprime a carga parasitária e ainda protege o hospedeiro de uma imunopatologia (BERN et al., 2011; SAMUDI et al., 1998; DE MORAIS et al., 2015).

Aqui vimos que apesar da maior produção de IFN- γ e óxido nítrico pelas células tratadas com rP21, o amastigota não sofreu diminuição de sua viabilidade e capacidade em se diferenciar em outras formas evolutivas. Tal fenômeno pode ser justificado pela ativação da produção de IL-4 concomitante com a de moléculas pró-inflamatórias, sugerindo ativação imunológica difusa,

levando a um balanço entre a resposta imune Th1 ou Th2, o que, provavelmente, permitiu a persistência do parasita no hospedeiro (DE MORAIS et al., 2015).

O tratamento de epimastigotas com a proteína recombinante P21 leva a prolongação do parasito na fase G1, diminuindo a fase de síntese S (TEIXEIRA, 2018). Além disso, sabe-se que a atuação da rP21 no arresto do ciclo celular é específica para *T. cruzi*, não tendo sido observado qualquer efeito na espécie *L. (L) amazonensis*. A progressão de qualquer célula eucariótica no ciclo celular é seletiva, sendo que a transição de G1 a fase S ocorre dependendo da presença ou não de nutrientes e de danos no DNA (PARDEE, 1974; ZHOU E ELLEDGE, 2000; DUMOULIN E BURLEIGH, 2018). Ao se tratar amastigotas com benznidazol, verifica-se que a maior proporção dos parasitos se encontra na fase G1, sendo que voltam vagarosamente ao estado replicativo normal após a retirada da droga. Essa plasticidade de modular o ciclo celular frente a situações estressantes no ambiente mostra que *T. cruzi* possui um sofisticado senso de resposta à estímulos externos, sendo uma importante forma de persistência do parasita no tecido do hospedeiro mamífero (DUMOULIN E BURLEIGH, 2018).

Nesse contexto, acreditamos que a atuação da rP21 na diminuição da replicação intracelular do parasito deve-se a um conjunto de fatores, na qual haveria atuação da barreira física citoplasmática devido ao citoesqueleto de actina mais polimerizado, bem como a existência de moléculas imunes produzidas pela célula hospedeira. Ambos mecanismos atuariam concomitantemente controlando a replicação e a indução da modulação do ciclo celular do parasita. No entanto, os mecanismos que explicariam tais fenômenos e a forma com que se relacionam ainda precisam ser esclarecidos.

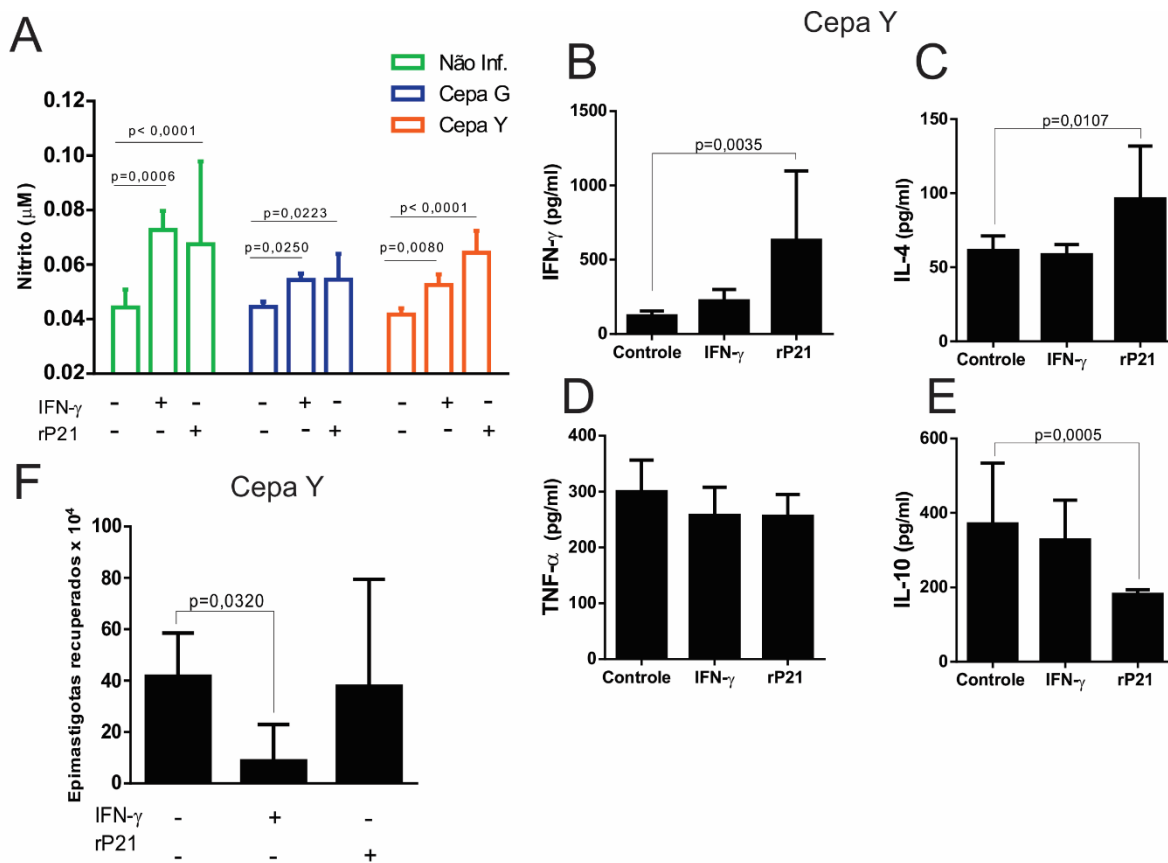


Figura 5. O tratamento com rP21 aumenta a produção de óxido nítrico (NO), IFN- γ e IL-4 por mioblastos infectados com cepa Y de *T. cruzi*, sem causar a morte do parasita. A. Os níveis de nitrito no sobrenadante de mioblastos infectados ou não e tratados com IFN- γ e rP21 foram mensurados e se mostraram maiores quando as células foram tratadas com rP21 ou IFN- γ . B. Mioblastos C2C12 infectados com a cepa Y e tratados com rP21 tiveram maior produção de IFN- γ e de (C) IL-4. Não foi observada diferença nos níveis de TNF- α nos diferentes grupos analisados (D), enquanto o tratamento com rP21 diminuiu os níveis de IL-10 (E). F. A habilidade dos amastigotas intracelulares recuperados de mioblastos tratados com rP21, de se diferenciarem em epimastigotas não foi alterada. Os dados estão expressos pela média \pm desvio padrão (SD) dos experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o one-way ANOVA e o teste de Tukey's para múltiplas comparações (A, B, C, D, E, F). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.2 O tratamento com a rP21 altera o perfil de parasitemia e diminui a carga parasitária de *T. cruzi* no tecido cardíaco

Observado o efeito da rP21 em diminuir a replicação *in vitro*, decidimos avaliar o efeito da rP21 durante a infecção aguda experimental por *T. cruzi*. Para isso, animais BALB/c foram infectados com duas cargas parasitárias diferentes: 10^6 e 10^5 de tripomastigotas na região subcutânea. O tratamento com PBS ou rP21 (100 μ g / animal) foi realizado no momento da infecção

e repetido no 5º e 15º dias pós-infecção. Nos animais infectados com 10^6 parasitos, foi observado um pico de parasitemia em torno do 8º dpi, sendo que o número de tripomastigotas sanguíneos foi significativamente maior no grupo tratado com rP21 neste momento da infecção (**Figura 6-A**). Enquanto isso, os animais infectados com 10^5 parasitos e tratados com rP21 mostraram pico de parasitemia em torno do 5º dpi, enquanto o grupo tratado com PBS apresentou pico em torno do 7º dpi significativamente maior que o observado no grupo rP21 (**Figura 6-B**).

Sabe-se que a rP21 aumenta a internalização de *T. cruzi* pela célula hospedeira, e induz inespecificamente o processo de fagocitose (RODRIGUES et al., 2012b; SILVA et al., 2009). Por meio dos resultados aqui obtidos, confirmamos que tal fenômeno se mantém *in vivo*, uma vez que a inoculação dos parasitos concomitantemente com a proteína recombinante promove a maior internalização desses protozoários, o que culmina na antecipação, bem como em um maior pico de parasitemia, nos animais tratados com rP21.

O tratamento foi também realizado nos dias 5 e 15 pós-infecção e observamos, pela análise de parasitemia subsequente, que o número de parasitos sanguíneos diminuiu ao longo do tempo nos grupos tratados com rP21 em ambos inóculos utilizados (**Figura 6-A e 6-B**). A análise histológica de tecido cardíaco mostrou redução significativa de ninhos de amastigotas nos animais tratados com rP21 (**Figura 6-C**). Foram encontrados ninhos em níveis quantificáveis apenas nos animais infectados com 10^6 parasitos, enquanto aqueles infectados com 10^5 foram passíveis de mensuração apenas por meio de qPCR. Os resultados de qPCR de tecido cardíaco mostraram que em ambos os grupos tratados com rP21, a carga de *T. cruzi* foi menor (**Figura 6-D e 6-E**).

A diminuição da carga parasitária nos grupos infectados que receberam o tratamento com rP21, corroboram com nossos achados *in vitro*, relatados aqui anteriormente. Assim, fica demonstrado que os efeitos biológicos da rP21 observados *in vitro*, se mantem *in vivo*, uma vez que a proteína aumentou a invasão de *T. cruzi* no hospedeiro, quando inoculada concomitantemente, como também controlou a replicação parasitária por meio dos tratamentos que se seguiram. Teixeira (2018) observou por meio de ensaio de infecção crônica experimental, que o tratamento com rP21 reduziu a carga de *T. cruzi* no tecido cardíaco em 50%, após 6 semanas de infecção, e com tratamento realizado a cada 72 horas. No entanto, no mesmo modelo de infecção com *L. (L) amazonensis*, a carga parasitária encontrada nas patas, foi 10 vezes maior quando os animais receberam a rP21 (TEIXEIRA, 2018).

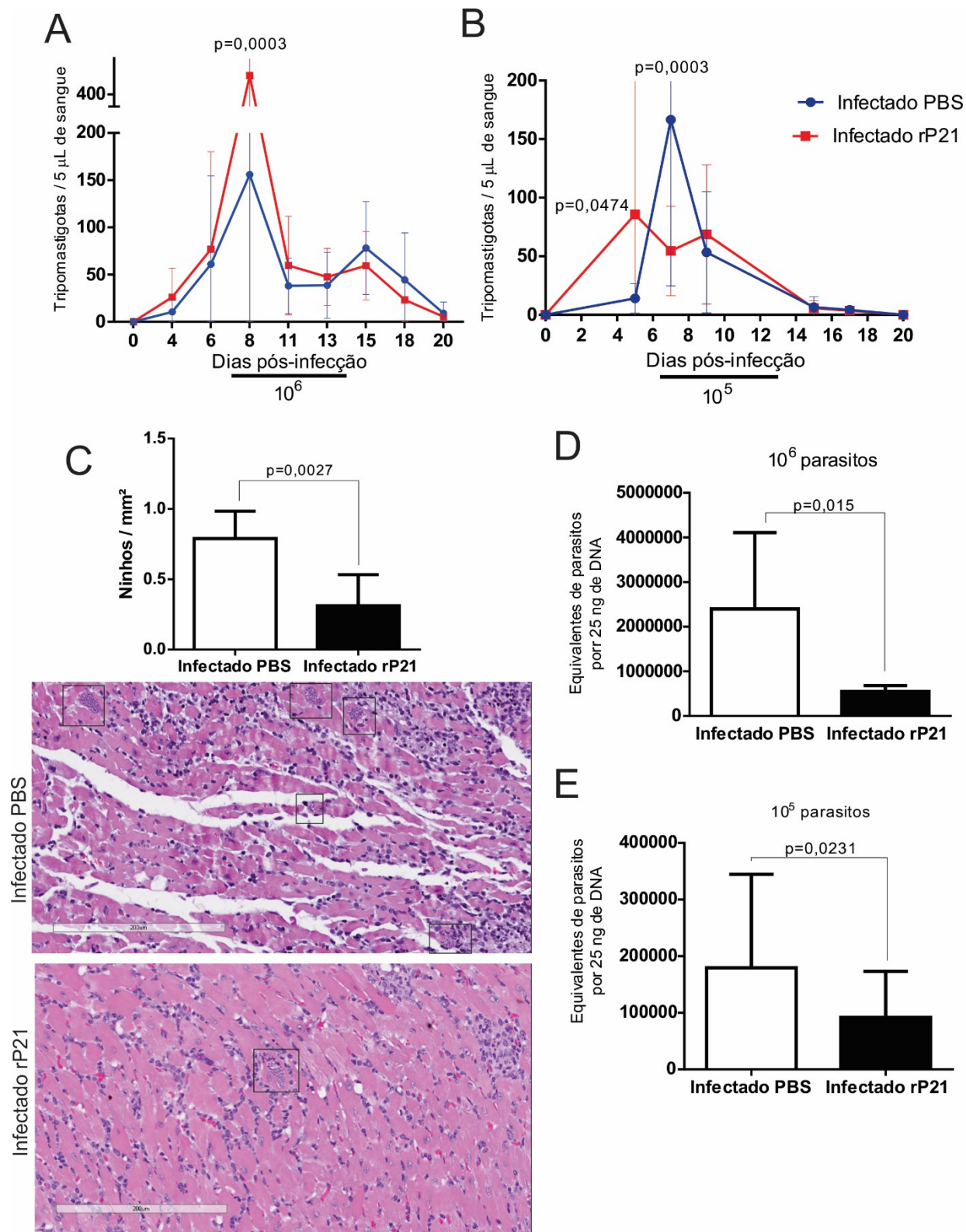


Figura 6. O tratamento *in vivo* com rP21 altera a cinética da parasitemia e reduz a carga parasitária de *T. cruzi* no coração. Animais BALB/c foram infectados com 10^6 (A) ou 10^5 (B) tripomastigotas na região subcutânea, e tratados com PBS ou rP21 (100 μ g) nos dias 0, 5 e 15 dias pós-infecção (dpi). A parasitemia

foi realizada a partir do 5º dpi. **A.** A contagem de tripomastigotas sanguíneos mostrou que o tratamento com rP21 levou a maior pico de parasitemia no 8º dia pós-infecção em animais infectados com 10^6 parasitos. **B.** A cinética de parasitemia de animais infectados com 10^5 mostrou pico antecipado naqueles tratados com rP21. **C.** O tratamento com a proteína recombinante diminui o número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco. Imagens representativas são mostradas, os retângulos destacam ninhos de amastigotas. Coloração feita com HE. Aumento de 100x. **D e E.** A quantificação de carga parasitária feita por qPCR mostra diminuição de *T. cruzi* no tecido cardíaco, quando é realizado o tratamento com rP21. **(D)** Inóculo de 10^6 . **(E)** Inóculo de 10^5 . Os dados estão expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata (qPCR). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se o teste two-way ANOVA (A, B), teste t Student's (two-sided) (C) e Mann-Whitney (D, E). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 A proteína P21 recombinante diminui o dano cardíaco, preservando a arquitetura vascular, diminuindo fibrose e o infiltrado inflamatório

Realizamos a análise qualitativa do tecido cardíaco nos diferentes grupos de animais. A **Tabela 1** mostra as diferentes variáveis analisadas conforme a intensidade, onde foi visto que o infiltrado inflamatório foi intenso (+++) no grupo infectado com 10^6 e tratado com PBS (**Figuras 7-C e E**), moderado (++) no grupo infectado com 10^6 e tratado com rP21 (**Figuras 7-D e F**), moderado no grupo infectado com 10^5 e tratado com PBS (++) (**Figura 7-G**) e leve (+) no infectado com 10^5 e tratado com rP21 (**Figura 7-H**). As setas pretas apontam o infiltrado inflamatório presente no tecido cardíaco dos diferentes grupos na **Figura 7**. Assim, em ambos os inóculos de parasitas utilizados para início da infecção, o tratamento com rP21 diminuiu a intensidade do infiltrado inflamatório.

Outro parâmetro analisado (**Tabela 1**) foi a destruição tecidual no coração dos diferentes grupos. Apenas o grupo Infectado- 10^6 +PBS apresentou destruição tecidual intensa (+++), enquanto os demais grupos infectados tiveram dano leve (+). A presença de ninhos de amastigotas cardíacos (retângulo) foi intensa (+++) no grupo infectado com 10^6 e tratado com PBS (**Figura 7-E**), moderada (++) no infectado com 10^6 e tratado com rP21, leve (+) no infectado com 10^5 e tratado com PBS e ausente no infectado com 10^5 e tratado com rP21. Tal resultado vai de encontro com a carga parasitária mensurada por qPCR na **Figura 6-D e 6-E**, e evidencia que a resposta inflamatória e destruição tecidual está diretamente ligada a carga de *T. cruzi* utilizada no momento do inóculo.

Foi observada calcificação do epicárdio moderada (++) nos animais do grupo Infectado- 10^6 +PBS e leve (+) no grupo Infectado- 10^6 +rP21 (**Figura 7-C**, seta branca), estando ausente nos animais infectados com 10^5 parasitas (**Figura 7-F e G**). A calcificação do epicárdio pode ser

resultado da destruição tecidual envolvendo morte celular e desnaturação de proteínas cardíacas, o que promove a precipitação de sais de cálcio, mecanismo este conhecido como calcificação distrófica (VIZCAÍNO-CASTILLO et al., 2014). Esse tipo de calcificação associa-se com lesão inespecífica do tipo degenerativa ou necrótica, sendo sugerido que a mesma é precedida de morte celular e injúria tecidual (ZHAO et al., 2009; VIZCAÍNO-CASTILLO et al., 2014).

No presente estudo, vimos que a calcificação coincide com o intenso infiltrado inflamatório, indicando uma relação entre o esforço para controle da infecção e o desenvolvimento da lesão (**Figura 7-C**). Foi recentemente relatado o aparecimento de calcificação e necrose de fibras musculares esqueléticas em decorrência da infecção com *T. cruzi* do grupo TcII, o mesmo da cepa Y utilizada aqui (SOLANA et al., 2012; VIZCAÍNO-CASTILLO et al., 2014). Placas de calcificação são estimuladas por macrófagos presentes no infiltrado inflamatório, uma vez que essas células enviam sinais osteogênicos para células musculares lisas vasculares (IKEDA et al., 2012; VIZCAÍNO-CASTILLO et al., 2014).

Dessa forma, a análise qualitativa do tecido cardíaco dos diferentes grupos mostra que há maior preservação da arquitetura tecidual nos animais infectados e tratados com a proteína rP21, independente da carga de inóculo. Essa preservação tecidual aparenta ter relação com contenção da replicação parasitária, onde *T. cruzi* confinado em ambiente intracelular resultaria em menor estímulo da resposta imunológica e, conseqüentemente, menor dano ao hospedeiro. Ao se manter dentro das fibras cardíacas, o parasita estaria menos propenso ao ataque do sistema imune, o que resultaria na perpetuação da infecção.

Grupos	Infiltrado inflamatório	Dano tecidual	Calcificação do epicárdio	Ninhos de amastigotas
Controle PBS	-	-	-	-
Controle rP21	-	-	-	-
Infectado PBS - 10⁶	+++	+++	++	+++
Infectado rP21 - 10⁶	++	+	+	++
Infectado PBS - 10⁵	++	+	-	+
Infectado rP21 - 10⁵	+	+	-	-

Tabela 1. Análise qualitativa das alterações no tecido cardíaco. Os diferentes fatores foram analisados conforme a intensidade, sendo o símbolo +++ atribuído para intenso, ++ para moderado, + para leve e - para ausente.

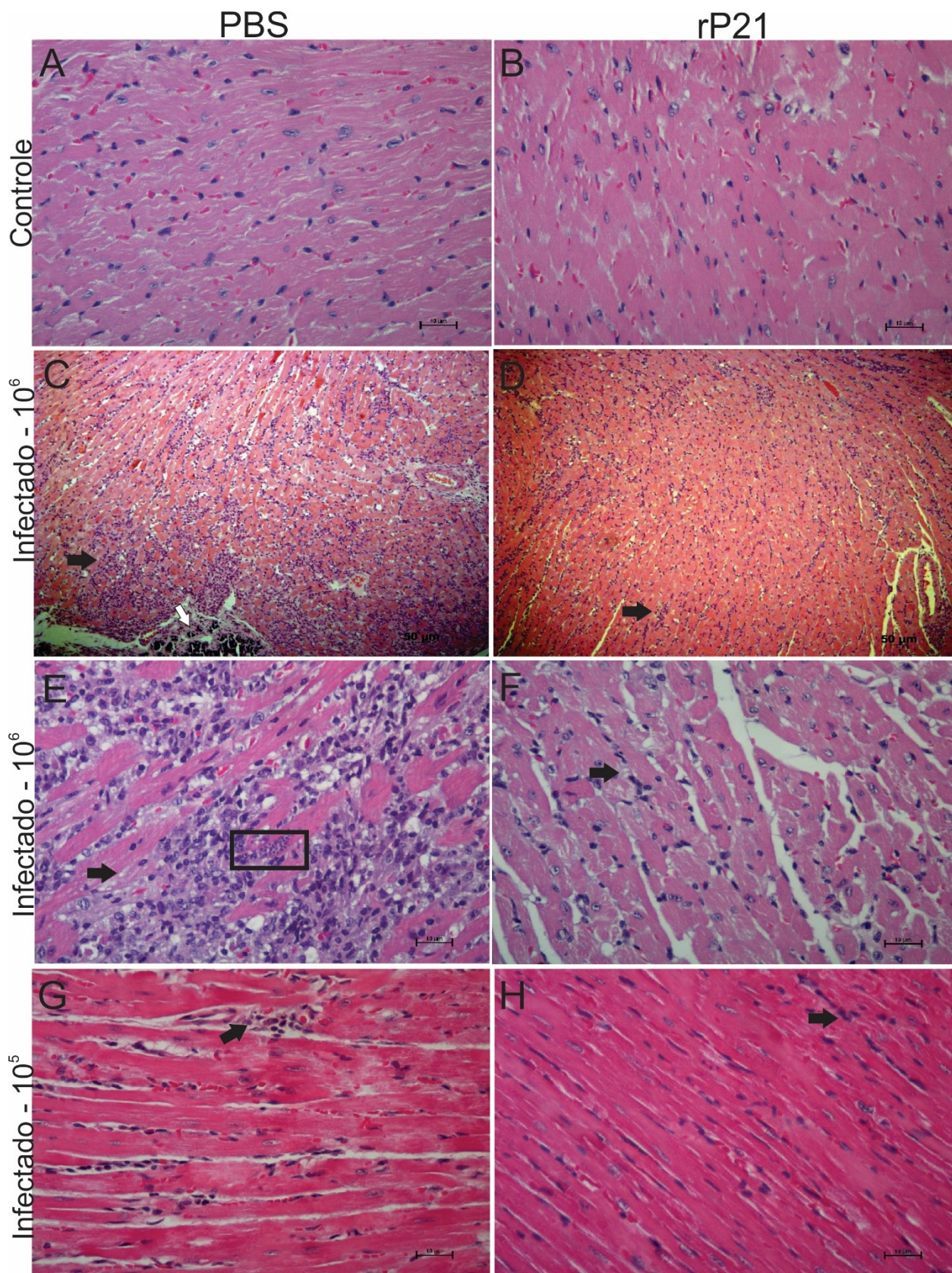


Figura 7. Imagens representativas de alterações histológicas cardíacas causadas pela infecção com 10^6 ou 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* e os efeitos do tratamento com rP21. Camundongos foram infectados

com 10^6 ou 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados ou não nos dias 0, 5 e 15 pós-infecção com rP21 (100 μ g/animal). Após 21 dias, os animais foram eutanasiados e fragmentos do coração foram analisados. **A.** Grupo não-infectado e tratado com PBS. **B.** Grupo não infectado e tratado com rP21. **C e D.** Grupos infectados com 10^6 tripomastigotas e tratado com PBS (**C**) e rP21 (**D**). Aumento de 100x. **E e F.** Infectados com 10^6 e tratados com PBS (**E**) ou rP21 (**F**). Aumento de 400x. **G e H.** Animais infectados com 10^5 tripomastigotas e tratados com PBS (**G**) e rP21 (**H**). Aumento de 400x. A seta branca aponta para área de calcificação. As setas pretas apontam para áreas de infiltrado inflamatório. O retângulo preto evidencia ninho de amastigotas. Coloração com HE. Análise descritiva é feita na Tabela 1.

Analisamos o impacto da proteína durante o processo de angiogênese nos grupos de animais infectados ou não. Como previamente descrito por Teixeira et al., (2015), a rP21 inibe a angiogênese *in vivo* e *in vitro*. Em modelo de implante de esponjas, foi observado diminuição na quantidade de hemoglobina nas esponjas tratadas com rP21 e menor número de vasos sanguíneos comparado ao grupo controle. No mesmo trabalho, células murinas endoteliais derivadas de hemangioma tímico (células tEnd) foram tratadas com diferentes concentrações de rP21 e tiveram sua capacidade de formação de vasos reduzida (TEIXEIRA et al., 2015).

Nosso estudo foi de encontro a esses dados, onde o tratamento com rP21 em camundongos não-infectados reduziu significativamente a quantidade de vasos sanguíneos no coração (**Figura 8-A**). No entanto, observamos diferente efeito nos grupos de animais infectados. A infecção por *T. cruzi* em si diminui a quantidade de vasos no tecido cardíaco, uma vez que vemos acentuada redução de vasos nos grupos infectado com 10^6 e tratado com PBS e infectado com 10^5 e tratado com PBS, quando comparado ao grupo não infectado-PBS (**Figura 8-A**). Por conseguinte, a rP21 levou a preservação de parte da arquitetura vascular do tecido cardíaco dos animais infectados com a maior carga de *T. cruzi* (10^6 tripomastigotas) quando comparado ao grupo infectado com 10^6 parasitos e tratados com PBS (**Figuras 8-A e 8-B**). Não há diferença estatística entre os grupos infectados com 10^5 tripomastigotas.

A modulação de expressão gênica de fatores ligados à angiogênese promovida pela rP21 foi anteriormente estudada com a utilização de células tEnd em modelos de cultura 2D e 3D (TEIXEIRA et al., 2017). Análises mostraram que o tratamento com a proteína recombinante promoveu inibição da proliferação celular e a maior expressão de fatores antiangiogênicos, como sFlt-1 e menor expressão de VEGFA, molécula com atividade pró-angiogênica (TEIXEIRA et al., 2017). Tal modulação da expressão gênica pode justificar o efeito aqui observado, no qual o tratamento com rP21 em camundongos não infectados levou à redução dos vasos sanguíneos no

tecido cardíaco analisado. No entanto, durante a infecção experimental aguda a rP21 atuou de forma indireta na preservação da arquitetura vascular tecidual em animais infectados, ao promover menor replicação de *T. cruzi*, bem como ao induzir menor infiltrado inflamatório e, conseqüentemente menor injúria tecidual e vascular.

O efeito da rP21 durante a infecção experimental crônica foi previamente estudada por nosso grupo de pesquisa (TEIXEIRA, 2018). No entanto, foi visto diminuição dos vasos sanguíneos em animais infectados cronicamente. É possível que a divergência destes resultados com a nossa análise se dê pela diferente cinética de infecção e tratamento aplicadas. No ensaio de infecção crônica, a infecção durou 42 dias e o tratamento com rP21 aconteceu a cada 72 horas, totalizando 14 tratamentos com a proteína. No nosso estudo, os animais foram eutanasiados no 21º dia pós-infecção, e o tratamento com a proteína recombinante aconteceu apenas 3 vezes. Assim, no caso da infecção crônica estudada por Teixeira (2018), a exposição mais intensa à proteína, juntamente com a proteína nativa secretada pelo parasita contido nos ninhos, favoreceu a atividade antiangiogênica da rP21 no tecido cardíaco.

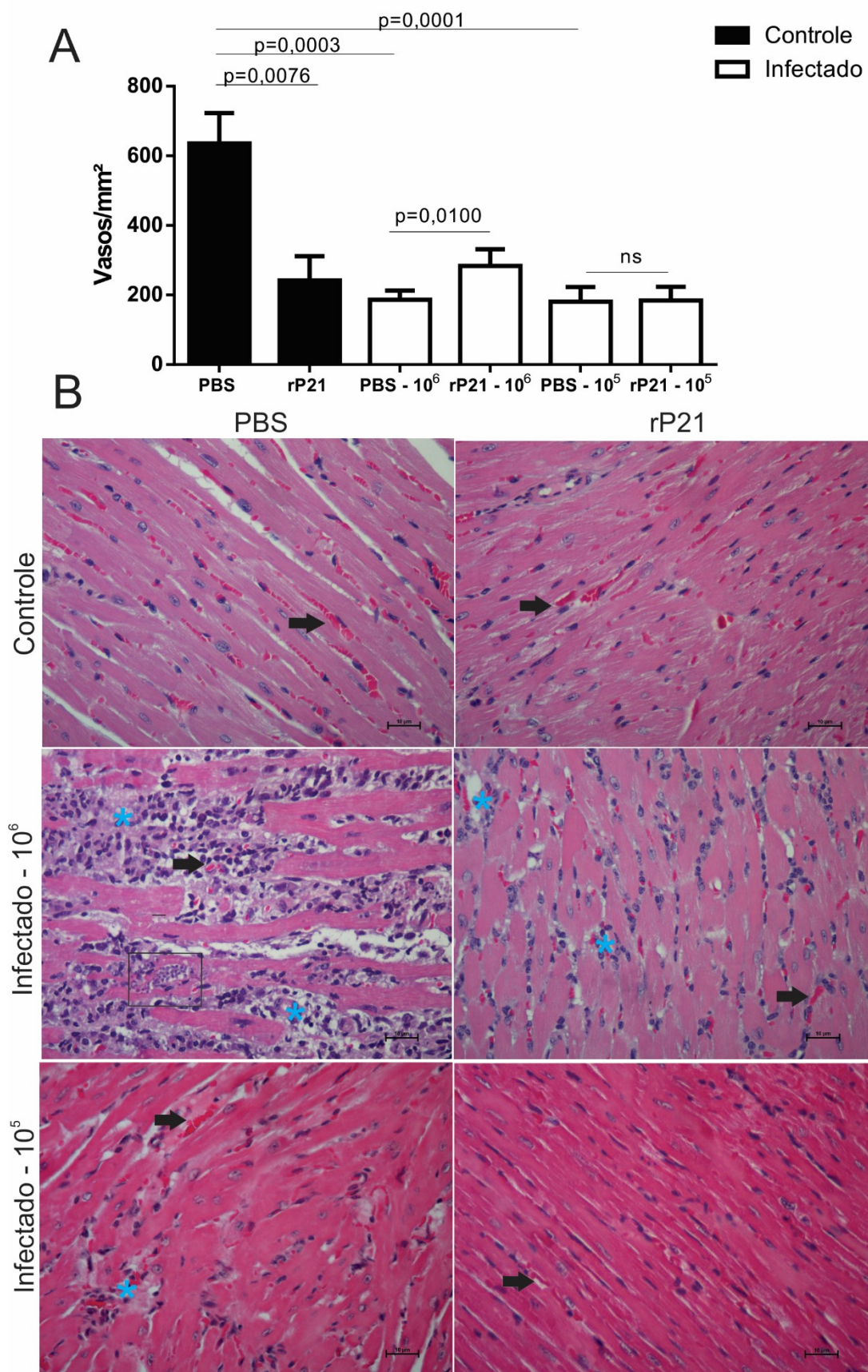


Figura 8. O tratamento com rP21 preserva a angiogênese cardíaca em animais infectados. A. O tratamento de camundongos saudáveis com rP21, reduz o número de vasos sanguíneos no coração. No entanto, em animais infectados com 10^6 tripomastigotas e tratados com rP21, a arquitetura vascular é preservada quando comparada com o grupo PBS infectado 10^6 . **B.** Imagens representativas de cada grupo são apresentadas. Coloração feita com HE. Aumento 400x. As setas pretas apontam vasos sanguíneos, os asteriscos azuis apontam áreas de infiltrado inflamatório. O retângulo preto evidencia ninho de amastigota. Os dados são expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão. Para o cálculo de diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o Dunn's para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a presença de mastócitos associados à infecção cardíaca por *T. cruzi* (ALMEIDA, PEREIRA, TAFURI, 1975; POSTAN, CORREA, FERRANS, TARLETON, 1994; MEUSER-BATISTA et al., 2008). No presente estudo, realizamos a contagem de mastócitos totais, granulados e degranulados no tecido cardíaco dos animais e observamos que a presença dos mastócitos totais e degranulados foi significativamente menor no grupo infectado com 10^6 e tratado com rP21 (**Figura 9-A**) quando comparado ao grupo infectado com 10^6 e tratado com PBS. Tal resultado pode ser associado com o menor recrutamento de células inflamatórias encontrado nos animais infectados e tratados com rP21 (**Tabela 1, Figura 7-C e D**). Observamos que o grupo não infectado e tratado com rP21 (**Figura 9-A e 9-B**) apresentou tecido cardíaco com maior número de mastócitos totais e degranulados quando comparado ao controle e ao grupo infectado com 10^6 e tratado com rP21, corroborando com estudos anteriores onde houve maior recrutamento de mastócitos em esponjas que receberam o tratamento com rP21, em animais desprovidos de infecção (TEIXEIRA et al., 2015). Não foram observadas diferenças entre os grupos na contagem de mastócitos granulados.

Mastócitos têm sido relacionados com a presença de disfunções cardiovasculares, como doença isquêmica cardíaca, infarto experimental do miocárdio, miocardite e insuficiência cardíaca (PALLADINI, TOZZI, PERLINI, 2003; FRANCIS & TANG, 2005; MARTIN et al., 1993; BROWEI & JANICKI, 2005; TEIXEIRA et al., 2015). Tafuri e Raso (1983) relataram mastocitose associada à DC experimental e propuseram que a mesma estaria diretamente relacionada com o aumento da fibrose tecidual.

Mastócitos podem responder a estímulos diferentes, e assim, participar de uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos, dependendo da forma como é ativado. Possuem grânulos de histamina, mediadores lipídicos e proteases como a quimase e a triptase que, quando ativados, entram em processo de degranulação, sendo tais mediadores liberados para o espaço

extracelular (KALESNIKOFF E GALLI, 2008; FARAHANI et al. 2010; OVERED-SAYER et al., 2014; VILELA, 2015).

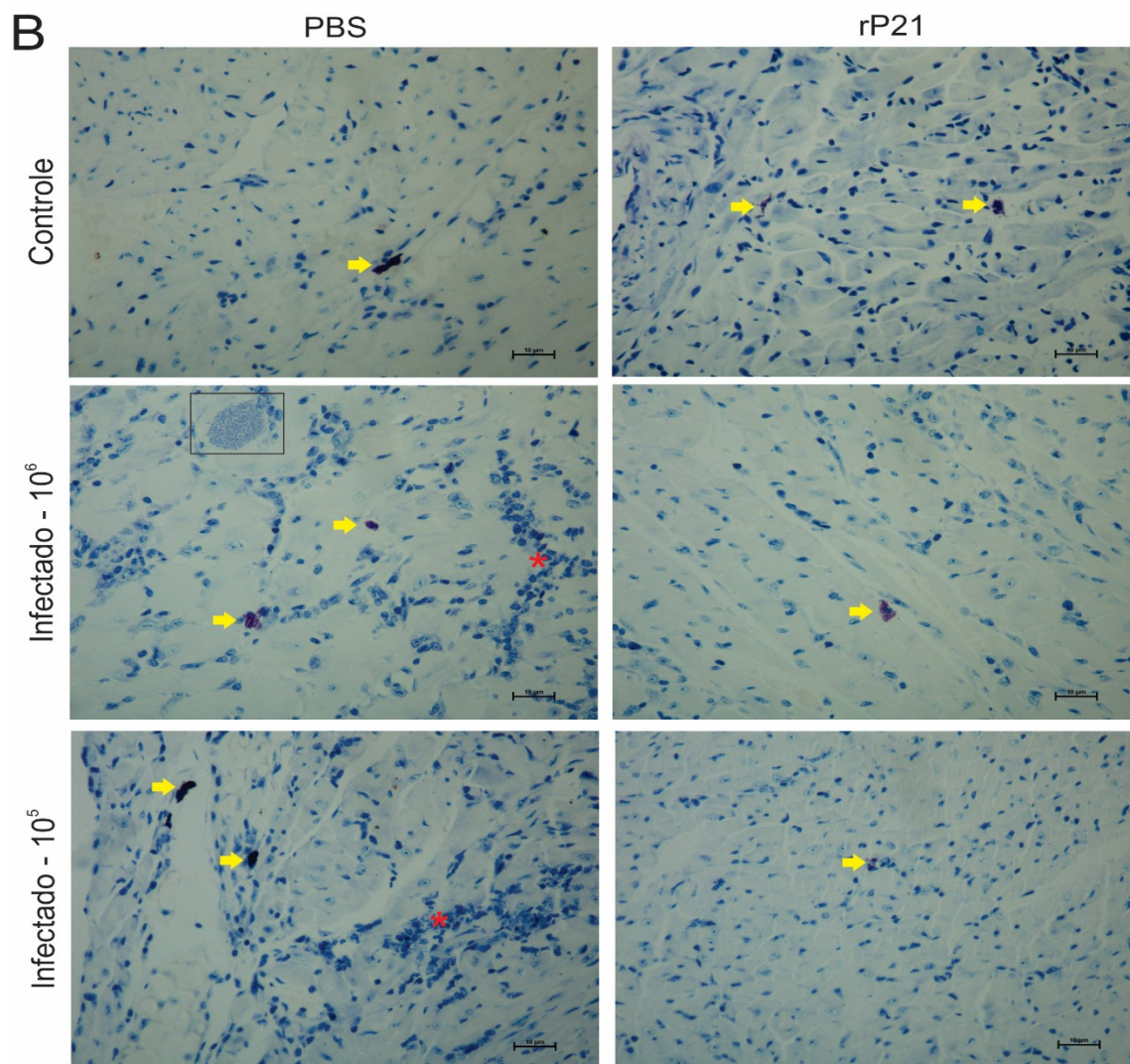
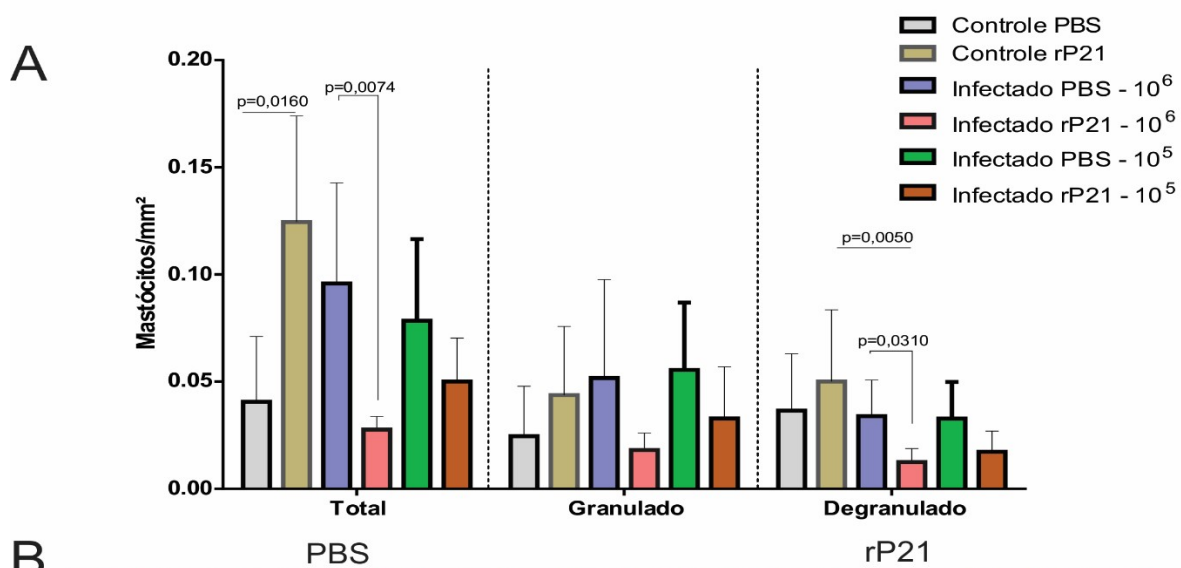


Figura 9. A rP21 diminui o recrutamento de mastócitos no tecido cardíaco em animais infectados com 10^6 , mas não nos animais desprovidos de infecção. Foi realizada a contagem de mastócitos totais, granulados e degranulados em tecido cardíaco previamente corados com Azul de Toluidina. **A.** A contagem mostra que a rP21 aumenta o número de mastócitos totais presentes em animais não infectados e tratados com rP21. Por outro lado, em animais infectados com 10^6 , o tratamento com rP21 diminui o recrutamento dessas células para o tecido cardíaco. Não foi constatada diferença significativa entre os grupos na contagem de mastócitos granulados. A quantificação de mastócitos degranulados mostra menor presença no grupo infectado com 10^6 tripomastigotas e tratados com rP21 comparado ao infectado com a mesma carga e tratado com PBS e ao grupo não infectado e tratado com rP21. **B.** Imagens representativas de cada grupo são mostradas. Coloração com azul de toluidina. Imagens capturadas no aumento de 400x. As setas amarelas apontam para os mastócitos, os asteriscos vermelhos indicam infiltrado inflamatório e o retângulo preto evidencia ninho de amastigota. Os dados são expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão. Para o cálculo de diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o Dunn's para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Após degranulação, ocorre o metabolismo de fosfolipídeos e os mastócitos secretam diversos mediadores químicos, como fatores de crescimento que estimulam a proliferação de miofibroblastos e produção de colágeno (FARAHANI et al., 2010; GARBUZENKO et al., 2002).

Existe no coração uma rede complexa e organizada de colágeno. Os principais subtipos encontrados neste local são os tipos I e tipo III, os quais correspondem a 95% do colágeno total. Dentre as principais funções dessas macromoléculas encontram-se a regulação da apoptose, da distensão do músculo cardíaco, bem como da transmissão de força durante a contração. Além disso, o colágeno relaciona-se à maior resistência a deformações patológica (ZANNAD et al., 2010; AZEVEDO et al., 2015).

Resolvemos assim, analisar as alterações na deposição do colágeno no tecido cardíaco, causadas pela infecção e tratamento com rP21. A avaliação da deposição de colágeno total, mostrou que o tratamento com rP21 diminuiu a área de fibrose cardíaca, de forma independente do inóculo de *T. cruzi* utilizado (**Figura 10-A e B**). A avaliação por microscopia polarizada mostrou que o tratamento com rP21 diminuiu a porcentagem (%) de área ocupada pelos colágenos tipo I e tipo III nos animais infectados (**Figura 10-C, D e E**). A área total de fibrose encontrada nos grupos infectados com 10^5 parasitos foi menor que nos grupos infectados com 10^6 (**Figura 10-A**). Esta relação foi também observada para o colágeno tipo III (**Figura 10-E**), sendo esse efeito explicado por se esperar que um inóculo maior de *T. cruzi* resulte em maior lesão tecidual e fibrose.

Durante a cardiomiopatia chagásica, são observadas inflamação do miocárdio, necrose e fibrose reparativa e reativa. A análise histológica de miocárdios de infecção experimental e de humanos mostram a deposição de grossas fibras de colágeno em torno dos cardiomiócitos (ANDRADE et al., 2011; LE LOUP et al., 2011; NOVA-RABELO et al., 2018). A progressão da fibrose está correlacionada com a dilatação ventricular, disfunção sistólica e arritmias ventriculares (DIAS et al., 1956). A maior área de fibrose observada no tecido cardíaco de animais infectados com 10^6 parasitas e tratados com PBS está diretamente relacionada com o maior dano tecidual e infiltrado inflamatório previamente relatado (**Tabela 1, Figura 7-C e E**). Existem vários trabalhos relacionando a maior síntese de colágeno com reações imunocelulares intensas (NOVA-RABELO et al., 2018), o que também justifica o efeito da rP21 em diminuir a área de fibrose nos animais infectados (**Figura 10**), tendo em vista que o nível de destruição tecidual foi menor nestes grupos.

Além dos colágenos tipo I e III, existe no miocárdio uma pequena proporção de colágenos tipo IV, V e VI, de pequena rigidez (SATO et al., 1983). O colágeno tipo I é mais resistente e predomina em estruturas como os tendões, sendo o tipo III mais flexível (BASHEY et al., 1992). O colágeno tipo IV é encontrado na camada média dos vasos e na membrana basal de células musculares e endoteliais, enquanto os tipos V e VI se localizam em torno dos miócitos (BASHEY et al., 1992; MATSUBARA et al., 1995).

Diversos estudos correlacionam a cardiomiopatia chagásica crônica com aumento de deposição espessa e densa de colágeno em substituição a regiões anteriormente ocupadas por cardiomiócitos (ROSSI, 1998). Tal remodelação da matriz extracelular predispõem o indivíduo à insuficiência e arritmias cardíacas (ROSSI JR et al., 2009; VILELA, 2015).

Aqui vimos que o grupo de animais infectados com 10^6 e tratados com PBS, apresentou maiores níveis de mastócitos totais e degranulados, junto com maior área de fibrose, e menor número de vasos sanguíneos do que animais infectados e tratados com rP21 (**Figura 9 e Figura 10**). Tal relação entre mastócitos, fibrose, e destruição da arquitetura vascular, já foi anteriormente vista em outros estudos. Pacientes chagásicos crônicos apresentaram maior porcentagem de colágeno correlacionado com alta densidade de mastócitos e ainda número reduzido de vasos sanguíneos no coração (PEREIRA et al., 2007; ROLDÃO et al., 2012; VILELA, 2015). Este fenômeno é parcialmente explicado pelo fato de mastócitos liberarem mediadores químicos, os quais estimulam o processo inflamatório e a produção de colágeno (GALLI et al., 2008;

GARBUZENKO et al., 2002). A menor densidade de vasos sanguíneos existente no grupo Infectado- 10^6 +PBS, por conseguinte, possivelmente relaciona-se com o fato da fibrose predispor à apoptose de células endoteliais, favorecendo a regressão de vasos sanguíneos (AMMENDOLA et al., 2013).

Assim, com base em todas análises histológicas realizadas nesse trabalho, evidenciamos que o tratamento com a rP21 durante a infecção aguda por *T. cruzi* foi benéfica aos camundongos, uma vez que diminuiu a replicação parasitária no coração, o que levou a menor recrutamento de células inflamatórias e, conseqüentemente, menor dano tecidual e menor fibrose. Enquanto isso, nos grupos infectados + PBS, podemos ver uma seqüência de eventos que culmina em maior comprometimento do tecido cardíaco. A inflamação exacerbada, induz a morte dos cardiomiócitos e a presença de mastócitos, estimula a produção de colágeno que, por sua vez, predispõe à apoptose de células endoteliais e diminui a densidade de vasos sanguíneos.

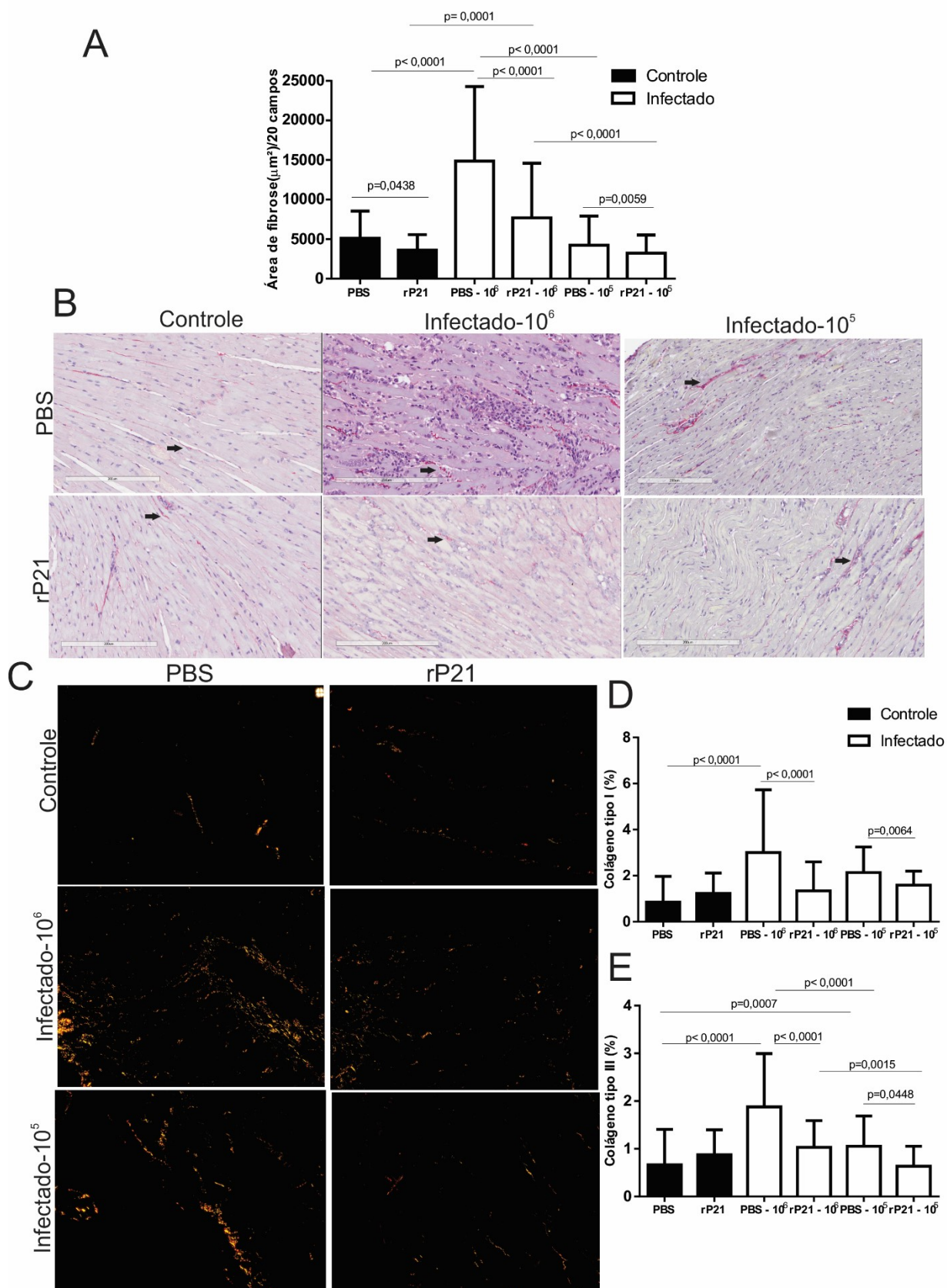


Figura 10. A rP21 diminui área de fibrose e os níveis de colágeno tipo I e tipo III no tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*. **A.** Quantificação de área total de fibrose mostra que o tratamento com rP21 diminui a deposição de colágeno em animais infectados ou não com *T. cruzi*. **B.** Imagens representativas de tecido cardíaco corado com Picrossirius Red são mostradas. Aumento de 100x. As setas pretas apontam para regiões vermelhas, onde se pode observar a presença de colágeno. **C, D e E.** Análise por microscópio de luz polarizada mostrou a porcentagem de área ocupada por colágeno do tipo I (**D**) e tipo III (**E**) no tecido cardíaco. Se pode observar que a rP21 diminui a % de colágeno tipo I (cor vermelha) e III (cor verde) em animais infectados com *T. cruzi*, mas não naqueles não infectados. **C.** Imagens representativas são mostradas: colágeno tipo I (cor vermelha), III (cor verde), sobreposição de ambos (cor amarela/alaranjada). Coloração com Picrossirius Red. Aumento de 200x. Os dados são expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão. Para o cálculo de diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o Dunn's para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.4 rP21 estimula a produção simultânea de IFN- γ e IL-10 *in vivo*

Citocinas possuem importante papel no controle da resposta imunológica e estão envolvidas nos mecanismos de resistência e imuno-patológicos da DC. A citocina IFN- γ é produzida por linfócitos de perfil Th1 e células *natural killer*. Seu papel protetivo se dá ao ativar macrófagos a produzirem outras citocinas protetoras, como a TNF- α , bem como metabólitos tóxicos para o parasita, como NO e espécies reativas de oxigênio (RODRIGUES et al., 2012a; TEIXEIRA et al., 2016; GUTIERREZ et al., 2009; PUPULIN et al., 2016). Por outro lado, a citocina IL-10 pode suprimir a ação de macrófagos ativados por IFN- γ , inibindo seus metabólitos tóxicos e sua diferenciação em Th1 (PUPULIN et al., 2016). Enquanto isso, a citocina IL-4 é secretada por mastócitos, eosinófilos e basófilos, sendo uma molécula reguladora da imunidade, a qual induz a diferenciação de células T *naives* (Th0) em Th2 (GADANI et al., 2012).

Para determinar o perfil imunológico dos camundongos submetidos à infecção e tratamento ou não com rP21, nós mensuramos os níveis séricos, cardíacos e esplênicos das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e TNF- α . Em animais infectados com 10^6 tripomastigotas, o tratamento com a rP21 levou a maior produção de IFN- γ no soro, coração e baço (**Figura 11-A, B, C**), quando comparado aos animais tratados com PBS. Além disso, os animais infectados com 10^6 tripomastigotas e tratados com a rP21 apresentaram maior produção de IFN- γ no soro e baço, quando comparado aos animais não infectados que receberam o mesmo tratamento (**Figura 11-A e C**). No coração, o grupo infectado com 10^5 tripomastigotas e tratado com rP21, apresentou maiores níveis de IFN- γ que o grupo não infectado e tratado com a proteína (**Figura 11-B**).

Aqui, observamos que os grupos infectados com ambas cargas de tripomastigotas (10^5 e 10^6) e tratados com rP21, apresentaram menor área de fibrose cardíaca e níveis diminuídos do colágeno tipo I e tipo III (Figura 10-A, D e E). Tal fenômeno pode estar correlacionado com os maiores níveis cardíacos de IFN- γ observados nesses animais (Figura 11 -B), uma vez que esta citocina foi descrita como potente inibidora da quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, além de atuar na diminuição da produção de macromoléculas da matriz extracelular (ADELMANN-GRILL et al., 1987; ELIAS et al., 1987). Tal mecanismo se deve pela ação antagônica aos efeitos de TGF- β (VARGA et al., 1990), uma vez que inibe a produção de colágeno tipo I *in vitro* e *in vivo* (HASEGAWA et al., 2002) e tipo III (GOLDRING et al., 1985), e diminui a síntese do mRNA de todos tipos de pró-colágenos em cultura de condrócitos humanos (GOLDRING et al., 1985).

A dosagem de IL-10, mostrou maior produção dessa citocina no soro e baço dos animais infectados com 10^6 e que receberam o tratamento com a proteína recombinante (**Figura 11-D e F**), não sendo observada diferença na análise do tecido cardíaco (**Figura 11- E**).

Em relação a dosagem de IL-4 e TNF- α , não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados (**Figura 12-A, B, C, D, E**), com exceção da dosagem de IL-4 do baço de animais infectados com 10^6 parasitas, que mostrou menor produção dessa citocina quando comparados aos animais infectados com 10^5 , independente do tratamento realizado (**Figura 12-C**).

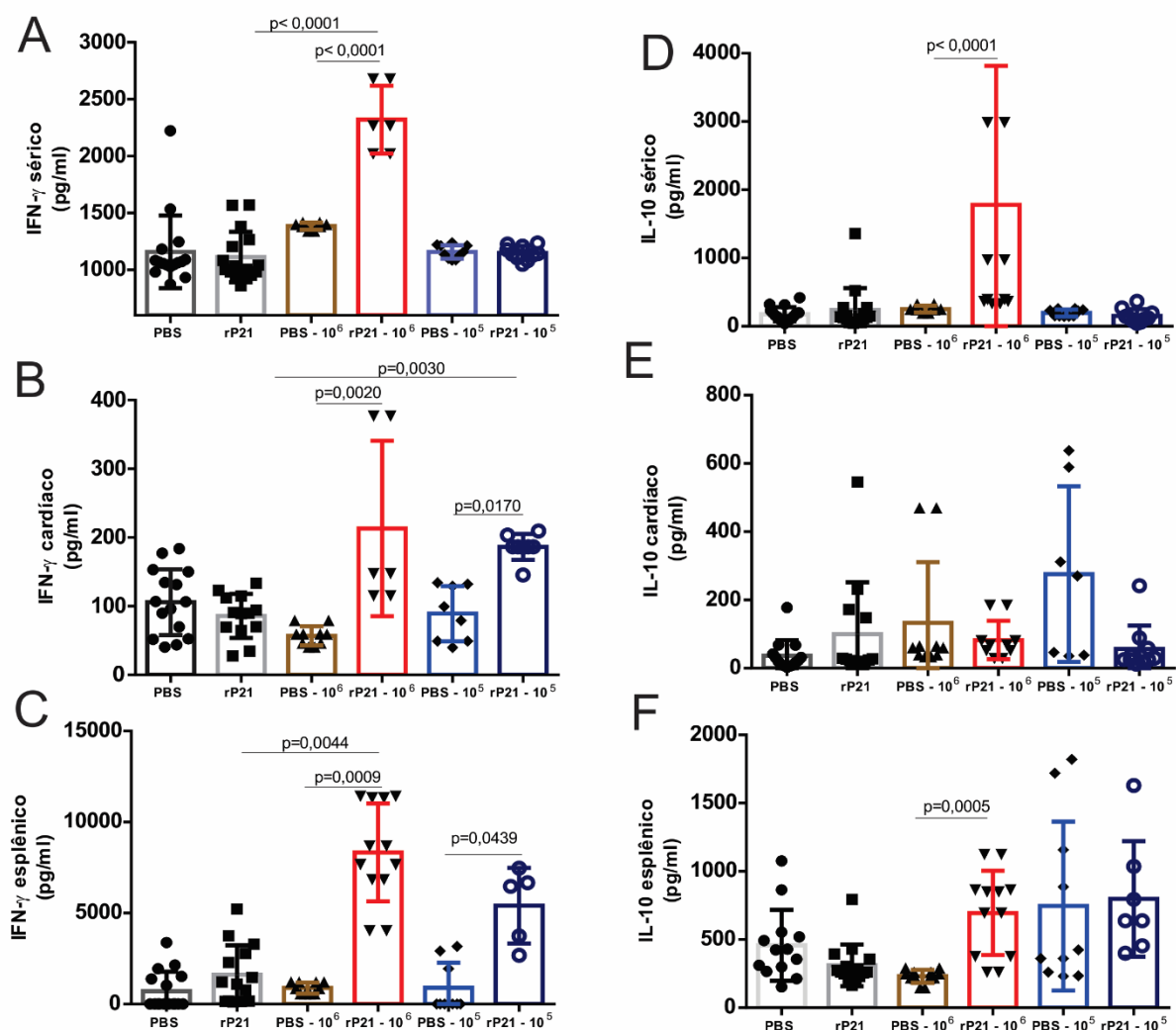


Figura 11. Camundongos tratados com rP21 apresentam altos níveis de IFN- γ e IL-10. A. Animais infectados e tratados com rP21 mostram maiores níveis de IFN- γ no soro, (B) coração e (C) baço. (D) Não foi encontrada diferença entre os grupos na dosagem de IL-10 (D) sérica e (E) cardíaca, mas os níveis estão aumentados no tecido esplênico (F) de animais tratados com rP21 e infectados com 10⁶ parasitas. As citocinas foram dosadas com a utilização do BD OptEIA™ ELISA kit, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os dados são expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão. Para o cálculo de diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o Dunn's para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Estudos prévios mostram que a rP21 induz a maior produção de IL-4 em modelo de implante de esponja em camundongos C57BL/6 (TEIXEIRA et al., 2015). Aqui obtivemos resultados que corroboram com essa informação nos ensaios *in vitro* (Figura 4-B), onde células C2C12 foram infectadas com TCTY e tratadas com rP21, enquanto *in vivo* não foram observadas diferenças estatísticas. Tal fenômeno pôde ser em parte justificado pelo fato da cinética de infecção

e tratamento serem diferentes (96 horas *versus* 21 dias) e pelo fato de o modelo *in vivo* possuir uma resposta fisiológica completa, diferente do ensaio *in vitro*. Isso não exclui a possibilidade da indução de produção de IL-4 em momentos diferentes do analisado *in vivo*. Em adição, outros componentes podem atuar em conjunto em um modelo *in vivo*, sendo a resposta final, a somatória de múltiplos fatores.

A citocina IFN- γ foi mais produzida tanto *in vitro* quanto *in vivo* ao se realizar tratamento com rP21. Na infecção aguda experimental, nós encontramos o estímulo simultâneo de IFN- γ e IL-10 em resposta ao tratamento com a proteína recombinante. Acreditamos que a produção de IL-10 seja por efeito regulatório, a fim de evitar inflamação exacerbada e, conseqüentemente, danos mais intensos ao hospedeiro, o que provavelmente está relacionado com a diminuição do dano tecidual cardíaco encontrado nos animais que receberam o tratamento com rP21 (**Tabela 1, Figura 7**). Tal produção já foi observada em estudos com amostras humanas, onde células mononucleares derivadas de sangue periférico (PBMCs) de crianças na fase aguda da infecção apresentaram alto perfil de expressão de RNA mensageiro para IFN- γ , IL-2 e IL-10, com baixos níveis de IL-4 (SAMUDI et al., 1998; DE MORAIS et al., 2015).

Tem sido postulado que a IL-10 direciona a doença para a forma indeterminada, desprovida de sintomas clínicos. Enquanto isso a cardiomiopatia chagásica é associada com intensa produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α (DUTRA et al., 2014; MEDINA et al., 2017). Animais nocautes para IL-10 e infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* foram capazes de controlar a parasitemia sanguínea e carga parasitária no coração. No entanto, os mesmos animais, apresentaram alta mortalidade devido aos efeitos tóxicos causados pela intensa resposta Th1, sendo a produção de IL-10 necessária para impedir o desfecho fatal (HUNTER et al., 1997; O’GARRA E VIEIRA, 2007; PUPULIN et al., 2016). O balanço entre citocinas pró-inflamatórias e a IL-10 é necessário para que o organismo tenha sucesso no controle da infecção, de modo que esta citocina não reduz a capacidade da imunidade celular em controlar os níveis de *T. cruzi* (DUTRA et al., 2014; PUPULIN et al., 2016).

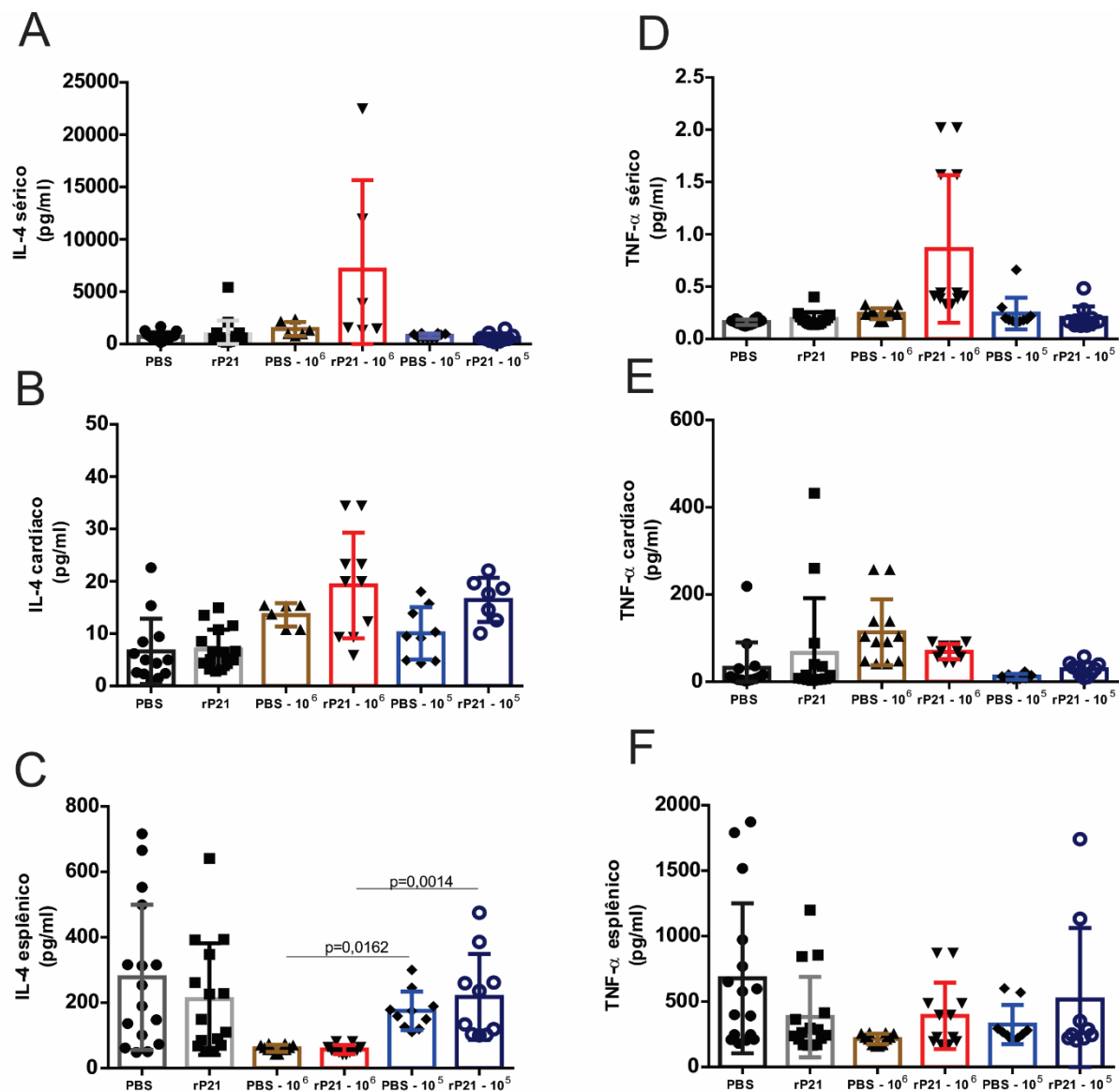


Figura 12. Os níveis de IL-4 e TNF- α não foram alterados com o tratamento com rP21. Os níveis de IL-4 no soro (A) e coração (B) não estão alterados entre os grupos analisados, enquanto no baço (C), os níveis de IL-4 são maiores nos animais infectados com 10^5 parasitos comparado aos com 10^6 . Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos em relação a produção de TNF- α no (D) soro, (E) coração e (F) baço. As citocinas foram dosadas com a utilização do BD OptEIA™ ELISA kit, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os dados são expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão. Para o cálculo de diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o Dunn's para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.5 A rP21 como potencial fator solúvel para a dormência induzida por estresse de *T. cruzi*

Analisamos os ninhos de amastigotas contidos no tecido cardíaco de animais infectados com 10^6 tripomastigotas de *T. cruzi*, quanto à capacidade de tais formas em secretar P21 nativa. Tal fenômeno já havia sido observado por nosso grupo de trabalho, onde amostras cardíacas de pacientes chagásicos apresentaram marcação para P21 nativa. Para isso, realizamos imunomarcação para P21 com anticorpo policlonal anti-P21, seguido de marcação com anticorpo secundário contendo fluorocromo verde (FITC). Realizamos também a marcação para *T. cruzi* com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*, seguido de marcação com anticorpo secundário contendo fluorocromo vermelho (TRITC), sendo as amostras analisadas por microscopia confocal. A quantificação de intensidade de fluorescência pelo *software* ImageJ (medida em unidades arbitrárias) demonstrou maior expressão de P21 nativa nos ninhos de amastigotas de animais que receberam o tratamento com a rP21 (**Figura 13-A e B**). Em associação, encontramos marcação mais intensa para *T. cruzi* nos animais infectados que receberam PBS como tratamento, o que é convergente com o resultado de maior carga parasitária encontrada nesse grupo, conforme descrito anteriormente (vide **Figura 7-C e D**).

Tal resultado nos levou a propor que a maior presença da rP21 poderia ser devido ao fato de haver mais estresse tecidual local, no caso gerado pela maior produção de IFN- γ nos animais tratados com a proteína recombinante (**Figura 10-B**). A citocina IFN- γ induziria um ambiente inóspito para a sobrevivência do parasita no tecido, o que levaria a produção de mais P21 nativa pelos amastigotas contidos nos ninhos cardíacos. A partir de tal suposição, pensamos se a P21 poderia ter sua produção induzida por condições de estresse.

Para responder tal questionamento realizamos experimentos *in vitro*, buscando verificar se em diferentes condições de estresse, amastigotas ou epimastigotas iriam expressar e secretar mais P21. Dessa forma, infectamos mioblastos C2C12 com a cepa Y de *T. cruzi* e tratamos com IFN- γ por 96 horas. A análise de RT-qPCR em tempo real mostrou maior expressão relativa do gene codificador da P21 na presença de IFN- γ (**Figura 13-D e E**). Enquanto isso, a análise do lisado de células infectadas por ELISA confirmou nosso resultado anterior, mostrando que houve maior produção de P21 quando as células infectadas foram tratadas com IFN- γ . Isso confirma nossa hipótese de que há regulação positiva de P21 quando o parasita intracelular é submetido a um ambiente contendo a citocina IFN- γ (**Figura 10-B e Figura 13-D e E**).

Analisamos também a produção de P21 por epimastigotas submetidos a estresse nutricional, condição indispensável para sua metaciclogênese no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. Para isso, cultivamos formas epimastigotas da cepa Y em meio sem soro fetal bovino (SFB) por 48 horas. Nossos resultados mostraram que houve maiores níveis de transcritos de P21 (detectada por RT-qPCR em tempo real), bem como maior síntese (detectada por ELISA) pelo parasita em estresse nutricional (**Figura 13-F e G**).

Durante o ciclo de vida de *T. cruzi* no vetor inseto triatomíneo, o parasita é exposto a condições de estresse nutricional no trato digestivo. Tais condições levam a modificações transcricionais e estruturais que resultam na diferenciação do epimastigota em tripomastigotas metacíclicos, forma eliminada nas fezes e responsável pela infecção do hospedeiro vertebrado (SHAW et al., 2016; VANRELL et al., 2017). Como nossos resultados mostram maior expressão de P21 por epimastigotas em condições de estresse nutricional, supomos que essa proteína pode ter potencial envolvimento no processo de metaciclogênese, necessitando de mais estudos para melhor elucidação.

Recentemente, um novo mecanismo de sobrevivência realizado por *T. cruzi* foi descrito. Sanchez-Valdez et al., (2018) descreveram a capacidade que *T. cruzi* tem em permanecer em estado de dormência quando enfrenta um ambiente de estresse. A dormência é um mecanismo bem descrito e elucidado em procariotos e desempenha papel crítico na sua adaptação a ambientes em mudança. A dormência do *T. cruzi* parece estar associada à evasão da resposta imune do hospedeiro, o principal estressor de amastigotas em hospedeiros vertebrados. Uma vez que a resposta imunitária pode levar à completa resolução da infecção (DIAS et al., 2008; TARLETON, 2013; SANCHEZ-VALDEZ et al., 2018), a dormência poderia facilitar a persistência do parasita no hospedeiro, já que o parasita invadiria uma célula e iria diminuir ou interromper sua replicação, escapando assim de ser detectado e eliminado pelo sistema imunológico.

Acredita-se que na maioria dos casos o parasita, após algum período, retornaria à sua taxa de replicação normal, para dar continuidade a seu ciclo de vida. Não se sabe se a dormência é consequência da biologia do *T. cruzi*, ou um processo evolutivamente selecionado para a persistência do parasita, mesmo que em baixos níveis. De fato, os mecanismos para entrar e sair do estado dormente por *T. cruzi* são completamente desconhecidos. Acredita-se que fatores

imunológicos do hospedeiro, em conjunto com moléculas solúveis produzidos pelo parasita, são fortes candidatos na modulação do mecanismo de dormência (SANCHEZ-VALDEZ et al., 2018).

Aqui, nós propomos que a P21 poderia ser um dos fatores que atuam para ativação da dormência de *T. cruzi*, uma vez que o tratamento com a proteína recombinante reduz a replicação de *T. cruzi*. Além disso, durante condições de estresse, tal proteína é mais expressa e ainda leva ao arresto do ciclo celular do parasita (TEIXEIRA, 2018).

O efeito da rP21 em diminuir a carga parasitária no curso da infecção *in vitro* e *in vivo*, pode ser devido a vários fatores, como relatado neste trabalho. No entanto, acreditamos que o principal mecanismo seja pela indução da dormência de *T. cruzi*. O efeito em diminuir a replicação é acompanhado de menores efeitos nocivos ao tecido hospedeiro, devido ao menor infiltrado inflamatório, menor área de fibrose e de alteração da arquitetura vascular cardíaca na infecção experimental aguda. Com a sobrevivência do hospedeiro e menor ativação de mecanismos de resposta imunológica, há consequente perpetuação do parasita e continuação do seu ciclo de vida. Assim, a P21 atuaria como um dos fatores que, evolutivamente, permite a persistência da infecção parasitária no hospedeiro.

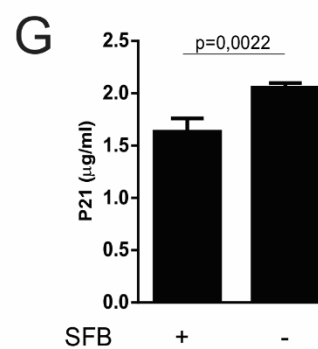
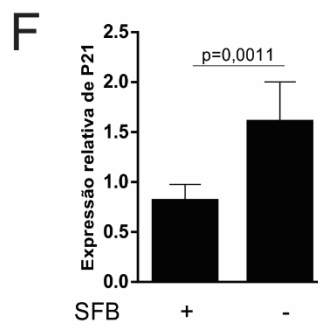
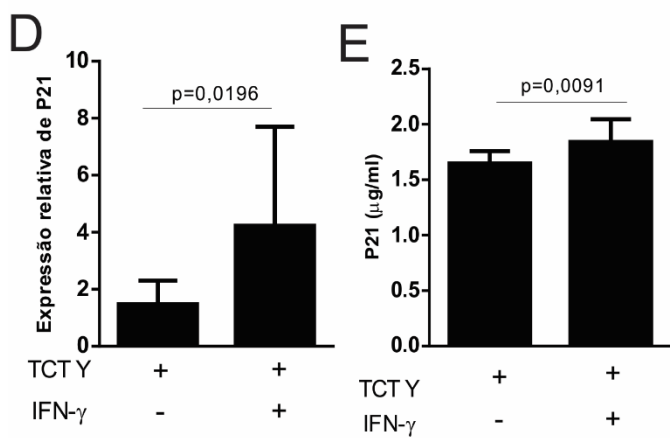
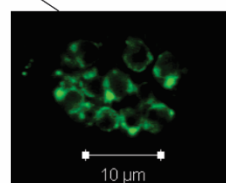
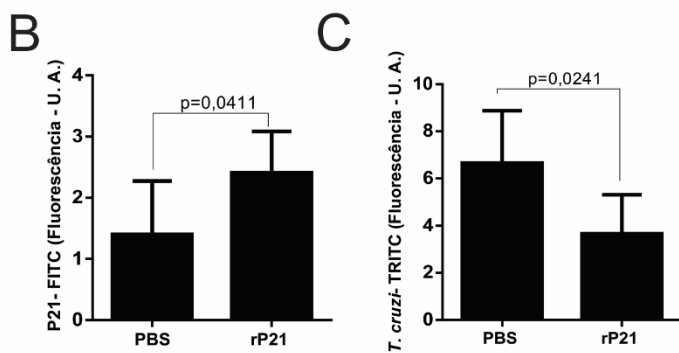
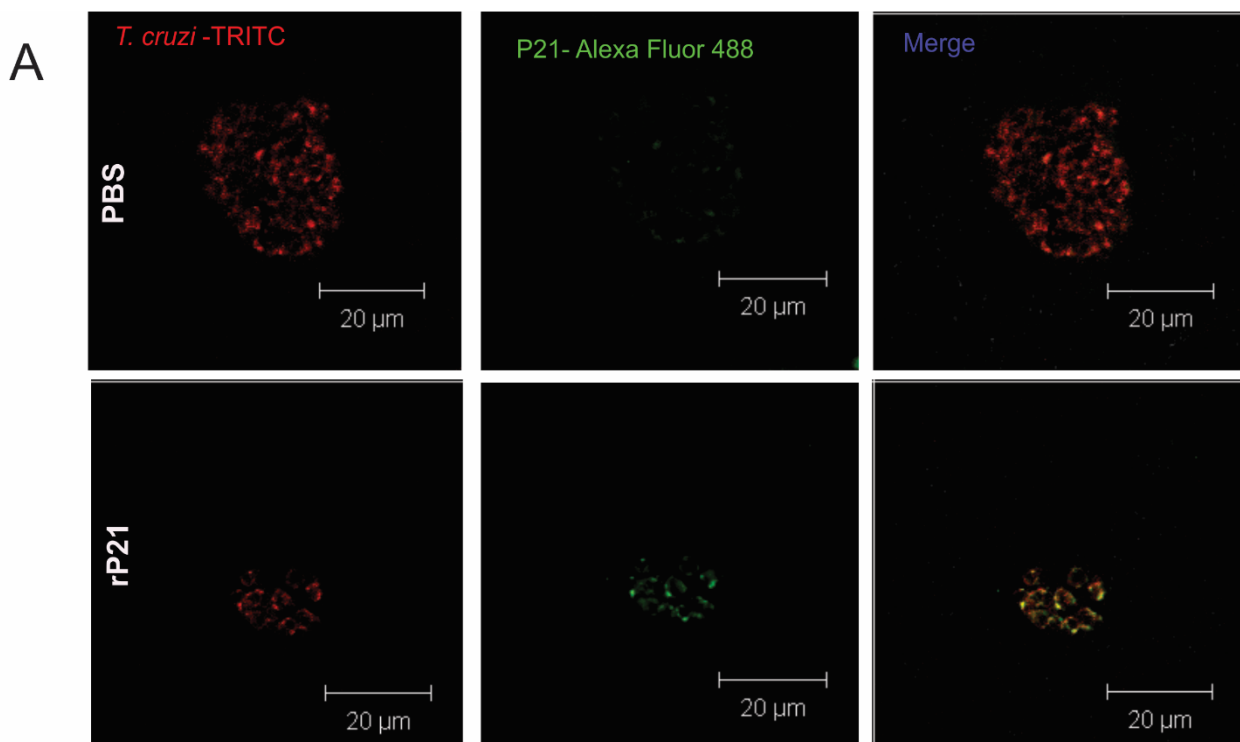


Figura 13. rP21 atua como fator solúvel agindo como indutor da dormência de *T. cruzi*. **A.** Imagens representativas de ninhos cardíacos de animais infectados com 10^6 tripomastigotas, obtidas por microscopia confocal. Os amastigotas de ninhos cardíacos produzem mais P21 nativa (marcada em verde - FITC), quando os animais recebem tratamento com a proteína recombinante. Os parasitas estão marcados em vermelho. Aumento de 63x. **B.** A quantificação de fluorescência mostra maior presença da P21 em ninhos de animais tratados com rP21, concomitante com a menor marcação para *T. cruzi* (**C**) presente nesse grupo. **D.** A P21 é mais expressa quando os mioblastos C2C12 infectados com a cepa Y são tratados com IFN- γ . **E.** O ELISA realizado com extrato bruto de células infectadas com TCTY mostram maior presença de P21 quando é realizado o tratamento com IFN- γ . (**F e G**) Epimastigotas submetidos a estresse nutricional possuem maior expressão (**F**) e produção (**G**) de P21 nativa. Os dados estão expressos como média de cada grupo (N amostral de 10 animais) \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata e em três vezes independentes. As diferenças estatísticas foram determinadas se utilizando o teste t Student's (C, E, F) e teste Mann-Whitney (B, D, G). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. Conclusão

No presente estudo foi possível elucidar diversas atividades biológicas da proteína recombinante P21, como aumento da polimerização do citoesqueleto de actina em células C2C12, diminuição da replicação intracelular de amastigotas das cepas Y e G de *T. cruzi in vitro*; Estímulo da produção de óxido nítrico e das citocinas IFN- γ e IL-4, sem alteração na viabilidade parasitária. Aqui aprofundamos o nosso estudo e analisamos o papel da rP21 durante a infecção experimental aguda por *T. cruzi*. O tratamento com a proteína levou à um quadro de menor carga parasitária cardíaca, independentemente da quantidade de tripomastigotas inoculados. Observamos diminuição do dano tecidual em animais que receberam tratamento com rP21, incluindo menor infiltrado inflamatório, menor fibrose e destruição da arquitetura vascular, além de modulação imunológica entre perfil Th1 e Th2. E por fim, detectamos que em condições estressantes, amastigotas e epimastigotas produzem mais P21 nativa.

Assim, propomos que a proteína P21 possua efeito positivo para *T. cruzi*, sob o ponto de vista evolutivo, uma vez que quando o parasita se encontra em condições inóspitas para sua sobrevivência, ele diminui sua taxa de replicação a fim de evadir dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro, perpetuando sua existência e continuação do ciclo biológico. Assim, propomos que a P21 atua como fator solúvel produzido pelo parasita em condições de estresse, que por mecanismos ainda desconhecidos, levaria o parasita à condição de dormência dentro da célula hospedeira.

7. Referências Bibliográficas

ADELMANN-GRILL, B. C.; HEIN, R.; WACH, F.; *et al.* Inhibition of fibroblast chemotaxis by recombinant human interferon gamma and interferon alpha. **Journal of Cellular Physiology**, v. 130, n. 2, p. 270–275, 1987. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041300213>

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta Tropica**, v. 35, n. 3, p. 209–219, 1978.

ALIBERTI, J C; CARDOSO, M A; MARTINS, G A; *et al.* Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1961–1967, 1996.

ALMEIDA, H. O.; PEREIRA, F. E.; TAFURI, W. L. [Mast cells in Chagas' chronic cardiopathy]. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 17, n. 1, p. 5–9, 1975.

ÁLVAREZ, J. M. *et al.* Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 9, June 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/912965>

ALVAREZ, Vanina E.; NIEMIROWICZ, Gabriela T.; CAZZULO, Juan J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 195–206, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>

ALVES, M. J.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; *et al.* 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, n. 1, p. 75–82, 1986. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90081-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90081-2)

AMMENDOLA, M.; ZUCCALA, V.; PATRUNO, R.; RUSSO, E.; LUPOSELLA, M.; AMOROSI, A.; GIUSEPPINA VESCIO, G.; SAMMARCO, G.; MONTEMURRO, S.; SARRO GB SACCO, R.; RANIERI, G. Tryptase-positive mast cells and angiogenesis in keloids: a new possible post-surgical target for prevention. **Springer Italia**. V. 65, p.53–57, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13304-012-0183-y>

ANDRADE, Jadelson Pinheiro de; MARIN NETO, Jose Antonio; PAOLA, Angelo Amato Vincenzo de; *et al.* I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 96, n. 6, p. 434–442, 2011.

ANDRADE, Jadelson Pinheiro de; MARIN NETO, Jose Antonio; PAOLA, Angelo Amato Vincenzo de; *et al.* I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 96, n. 6, p. 434–442, 2011.

ANDRADE, L. O., *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol Biochem Parasitol**, v. 100, p. 163–72, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)90035-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)90035-X)

ANDRADE, L. O., et al. *Trypanosoma cruzi*: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp Parasitol**, v. 100, p. 269–75, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(02\)00024-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(02)00024-3)

ANDRADE, Zilton A. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 71–80, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700007>

ANDREWS, N. W.; KATZIN, A. M.; COLLI, W. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. **European Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 3, p. 599–604, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08144.x>

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v. 71, n. 2, p. 103–109, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(99\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(99)00172-8)

AZEVEDO, Paula S.; POLEGATO, Bertha F.; MINICUCCI, Marcos F.; et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20160005>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>

BAIDA, Renata C. P.; SANTOS, Márcia R. M.; CARMO, Mirian S.; et al. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1537–1546, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1537-1546.2006>

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

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

BASHEY, R. I.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; JIMENEZ, S. A. Isolation, characterization, and localization of cardiac collagen type VI. Associations with other extracellular matrix components. **Circulation Research**, v. 70, n. 5, p. 1006–1017, 1992. <https://doi.org/10.1161/01.RES.70.5.1006>

BENZIGER, Catherine Pastorius; DO CARMO, Gabriel Assis Lopes; RIBEIRO, Antonio Luiz Pinho. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31–47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.08.013>

BERN, Caryn; MARTIN, Diana L.; GILMAN, Robert H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 19–47, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>

BERN, Caryn; MONTGOMERY, Susan P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases**

Society of America, v. 49, n. 5, p. e52-54, 2009. <https://doi.org/10.1086/605091>

BERN, Caryn; MONTGOMERY, Susan P.; HERWALDT, Barbara L.; et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>

BOMBEIRO, A. L. et al. IL-12p40 deficiency leads to uncontrolled *Trypanosoma cruzi* dissemination in the spinal cord resulting in neuronal death and motor dysfunction. **PLoS ONE**, vol.7, n.11, p. e49022, November 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049022>

BONNEY, Kevin M.; LUTHRINGER, Daniel J.; KIM, Stacey A.; et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology**, v. 14, p. 421–447, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>

BOWMAN, Natalie M.; KAWAI, Vivian; LEVY, Michael Z.; et al. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 12, p. 1822–1828, 2008. <https://doi.org/10.1086/588299>

BRADFORD, M.M. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

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

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347 – 382, October 1973. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>

BRENIÈRE S. F., et al. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 8, p. e0004792, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>

BRÍGIDO, Rebecca Tavares E. Silva; TAVARES, Paula Cristina Brígido; SANTOS, Marlus Alves Dos; et al. *Trypanosoma cruzi* modulates gene expression of plasma membrane repair-related proteins. **Acta Tropica**, v. 174, p. 153–157, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.008>

BROWER, Gregory L.; JANICKI, Joseph S. Pharmacologic inhibition of mast cell degranulation prevents left ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats. **Journal of Cardiac Failure**, v. 11, n. 7, p. 548–556, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2005.05.005>

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 175–200, 1995. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.49.1.175>

CALER, E. V.; VAENA DE AVALOS, S.; HAYNES, P. A.; et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO journal**, v. 17, n. 17,

p. 4975–4986, 1998. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.17.4975>

CARROLL, Maria V.; SIM, Robert B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 12, p. 965–975, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.005>

CESTARI, Igor; ANSA-ADDO, Ephraim; DEOLINDO, Poliana; et al. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>

CESTARI, Igor; EVANS-OSSES, Ingrid; SCHLAPBACH, Luregn J.; et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 4, p. 328–334, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.015>

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159 – 218, Agosto 1909. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>

CHAVES, A. T., et al. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 191, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1523-1>

CHEN, L.; WATANABE, T.; WATANABE, H.; et al. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 265–275, 2001. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200101\)31:1<265::AID-IMMU265>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200101)31:1<265::AID-IMMU265>3.3.CO;2-C)

CLAYTON, J. Chagas disease. **Nature**, v. 465, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09224>

COLLI, Walter; COLLI, Walter. Interiorization of *Trypanosoma cruzi* into mammalian host cells in the light the parasite membrane chemical composition. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 45–50, 1984. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761984000500010>

COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.25, p.24085–24094, June 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412802200>

CONTEH, Lesong; ENGELS, Thomas; MOLYNEUX, David H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61422-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61422-7)

CORTEZ, Mauro; NEIRA, Ivan; FERREIRA, Daniele; et al. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6184–6191, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6184-6191.2003>

COURA, J. R. E VIAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p.S6–S7, June 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09221>

CUERVO, Henar; PINEDA, Miguel A.; AOKI, M. Pilar; et al. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 12, p. 1772–1782, 2008. <https://doi.org/10.1086/529527>

DA COSTA, T. A. et al. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: Toward Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting TcI and TcII Populations. **Journal of Immunology Research**. v. 2014, p. 2-12, ID 962047, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/962047>

DA MATTA GUEDES, Paulo Marcos; GUTIERREZ, Fredy R. S.; MAIA, Flavia L.; et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>

DA SILVA, Marcos Vinicius; DE ALMEIDA, Vera Lúcia; DE OLIVEIRA, Wendyson Duarte; et al. **Upregulation of Cardiac IL-10 and Downregulation of IFN- γ in Balb/c IL-4 $^{-/-}$ in Acute Chagasic Myocarditis due to Colombian Strain of *Trypanosoma cruzi***. Mediators of Inflammation. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2018/3421897/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.1155/2018/3421897>

DE ALMEIDA, M. L.; HEISE, N. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. **Biological Research**, v. 26, n. 1–2, p. 285–312, 1993.

DE ARAÚJO, F. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M. O. C.; et al. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768–777, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.04.008>

DE ARAÚJO, Karine Canuto Loureiro; TEIXEIRA, Thaise Lara; MACHADO, Fabrício Castro; et al. AFAP-1L1-mediated actin filaments crosslinks hinder *Trypanosoma cruzi* cell invasion and intracellular multiplication. **Acta Tropica**, v. 162, p. 167–170, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.028>

DE BONA, Elidiana; LIDANI, Kárita Cláudia Freitas; BAVIA, Lorena; et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1842, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>

DE MORAIS, Carlos Gustavo Vieira; CASTRO LIMA, Ana Karina; TERRA, Rodrigo; et al. **The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection**. BioMed Research International. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/324915/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.1155/2015/324915>

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

DIAS, E.; LARANJA, F. S.; MIRANDA, A.; et al. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and

pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p. 1035–1060, 1956. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.14.6.1035>

DIAS, João Carlos Pinto; DIAS, Emmanuel; M. FILHO, Olindo; et al. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 505–506, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500014>

DOS SANTOS, M. A. **A infecção das células B por *Trypanosoma cruzi* resulta em ativação da Caspase-7, clivagem proteolítica da PLC γ 1 e morte celular.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. 2017. 71 p.

DUMOULIN, Peter C.; BURLEIGH, Barbara A. Stress-Induced Proliferation and Cell Cycle Plasticity of Intracellular *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. **mBio**, v. 9, n. 4, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.00673-18>

DUTRA, Walderez O.; MENEZES, Cristiane A.S.; MAGALHÃES, Luisa M. D.; et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 377–387, 2014.

ECHEVERRIA, Luis E.; MORILLO, Carlos A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019. (Updates in Tropical Medicine). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>

ELIAS, Jack A.; JIMENEZ, Sergio A.; FREUNDLICH, Bruce. Recombinant Gamma, Alpha, and Beta Interferon Regulation of Human Lung Fibroblast Proliferation. **American Review of Respiratory Disease**, v. 135, n. 1, p. 62–65, 1987.

ENGEL, Juan C.; DOYLE, Patricia S.; HSIEH, Ivy; et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998. <https://doi.org/10.1084/jem.188.4.725>

FABBRO, Diana L.; DANESI, Emmaria; OLIVERA, Veronica; et al. Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 11, p. e3312, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>

FARAHANI, Shokoufeh Shahrabi; NAVABAZAM, Alireza; ASHKEVARI, Firoozan Sadr. Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. **Pathology, Research and Practice**, v. 206, n. 3, p. 151–155, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2009.10.006>

FERNANDES, Maria Cecilia; ANDREWS, Norma W. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012.

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

(Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 45f. 2013.

FERRARESSO, M. G. et al. Chagas disease reactivation: cutaneous manifestations in a transplanted patient. **An Bras Dermatol**, v. 93, n. 6, p. 890-2, 2018. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187855>

FERREIRA, A. V. et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12-13, p. 1002–1005, November 2011. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.002>

FERREIRA, Adaliene Versiani Matos; SEGATTO, Marcela; MENEZES, Zélia; et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 1002–1005, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.002>

FERREIRA, Viviana; VALCK, Carolina; SÁNCHEZ, Gittith; et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 5, p. 3042–3050, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3042>

FLÓREZ, O., MARTÍN, J., GONZÁLEZ, C.I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 33, p. 506–511, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01314.x>

FRANCIS, Gary S.; TANG, W. H. Wilson. Histamine, mast cells, and heart failure: is there a connection? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 7, p. 1385–1386, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.014>

FRESNO, Manuel; GIRONÈS, Núria. Regulatory Lymphoid and Myeloid Cells Determine the Cardiac Immunopathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5838393/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00351>

GADANI, Sachin P.; CRONK, James C.; NORRIS, Geoffrey T.; et al. Interleukin-4: A Cytokine to Remember. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>

GALLERANO, V. et al. Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant. **Int J Dermatol**, v. 46, p. 607-10, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03127.x>

GALLI, S.J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2327>

GARBUZENKO, E.; NAGLER, A.; PICKHOLTZ, D.; et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical**

Immunology, v. 32, n. 2, p. 237–246, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2002.01293.x>

GAULTON, G. N.; PRATT, J. C. Glycosylated phosphatidylinositol molecules as second messengers. **Seminars in Immunology**, v. 6, n. 2, p. 97–104, 1994. <https://doi.org/10.1006/smim.1994.1014>

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an Larginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1992. <https://doi.org/10.1002/eji.1830221006>

GOLDRING, M. B.; SANDELL, L. J.; STEPHENSON, M. L.; et al. Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 19, p. 9049–9055, 1986.

GOMES, J. a. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; ROCHA, M. O. C.; et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003>

GOMES, J. A., et al. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. **Immunobiology**, v. 217, n. 10, p.1005–16, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.01.014>

GOMES, J. A., et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect Immun**, n. 73, v. 12, p. 7960-6, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7960-7966.2005>

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** v.126, p. 131-138, 1982. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)

GRINDLAY JH, WAUGH JM. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. **American Medical Association Archives of Surgery**. (1951). 63:288-97. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1951.01250040294003>

GUARNER, J.; BARTLETT, J.; ZAKI, S. R.; et al. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 152–158, 2001. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.152>

GUEDES, Paulo M. M.; SILVA, Grace K.; GUTIERREZ, Fredy R. S.; et al. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, n. 5, p. 609–620, 2011. <https://doi.org/10.1586/eri.11.31>

GUEDES, Paulo Marcos Matta; GUTIERREZ, Fredy Roberto Salazar; SILVA, Grace Kelly; et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6,

n. 4, p. e1630, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001630>

GUERRERO, Néstor A.; CAMACHO, Mercedes; VILA, Luis; et al. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 8, p. e0004025, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004025>

GUTIERREZ, Fredy R. S.; MINEO, Tiago W. P.; PAVANELLI, Wander R.; et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 236–245, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900030>

HASEGAWA, Toshio; NAKAO, Atsuhito; SUMIYOSHI, Koji; et al. IFN-gamma fails to antagonize fibrotic effect of TGF-beta on keloid-derived dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 32, n. 1, p. 19–24, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(03\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(03)00044-6)

HIGUCHI, M. de L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 39, n. 1, p. 53–60, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000100012>

HISSA, B.; ANDRADE, L. O. Trypanosoma cruzi uses a specific subset of host cell lysosomes for cell invasion. **Parasitology International**, v. 64, p. 135–138, 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/91593> >. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.11.005>

HU, Qiongyi; GONG, Wen; GU, Jieyu; et al. Plasma microRNA Profiles as a Potential Biomarker in Differentiating Adult-Onset Still's Disease From Sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6338094/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03099>

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 158, n. 7, p. 3311–3316, 1997.

IKEDA, Koji; SOUMA, Yuka; AKAKABE, Yoshiki; et al. Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 1, p. 39–44, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.045>

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n.4, p. 447–55, Jul 1979. ISSN 0018-2214. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S.J. New developments in mast cell biology. **Nature Immunology**. V. 9, n. 11, p. 1215–1223, 2008. <https://doi.org/10.1038/ni.f.216>

KRATZ, Jadel Müller; GARCIA BOURNISSEN, Facundo; FORSYTH, Colin J.; et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.

<https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LE LOUP, Guillaume; PIALOUX, Gilles; LESCURE, François Xavier. Update in treatment of Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 428, 2011. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a667f>

LEE B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect Dis**, v.13, n. 4, p.342–8, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)

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

LEWIS, Michael D.; KELLY, John M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 899–911, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.08.009>

LIDANI, Kárita C. F.; BAVIA, Lorena; AMBROSIO, Altair R.; et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 607, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>

LINHARES-LACERDA, Leandra; GRANATO, Alessandra; GOMES-NETO, João Francisco; et al. Circulating Plasma MicroRNA-208a as Potential Biomarker of Chronic Indeterminate Phase of Chagas Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 269, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00269>

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

LUZ, Paola R.; BOLDT, Angelica B. W.; GRISBACH, Caroline; et al. Association of L-Ficolin Levels and FCN2 Genotypes with Chronic Chagas Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617223/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060237>

LUZ, Paola Rosa; MIYAZAKI, Márcia I.; CHIMINACIO NETO, Nelson; et al. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004257, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004257>

MACEDO, A. M., et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, :1–12, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100001>

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

MACHADO, Fabiana S.; DUTRA, Walderez O.; ESPER, Lisia; et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>

MAGALHÃES, L.M.D. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9,p.1-17, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003816>

MAGALHÃES, Luisa M. D.; VILLANI, Fernanda N. A.; NUNES, Maria do Carmo P.; et al. High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 4, p. 661–665, 2013. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis724>

MÁLAGA, Sergio; YOSHIDA, Nobuko. Targeted Reduction in Expression of *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein gp90 Increases Parasite Infectivity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 353–359, 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.353-359.2001>

MANNE-GOEHLER, Jennifer; UMEH, Chukwuemeka A.; MONTGOMERY, Susan P.; et al. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005033, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005033>

MARCON, Gláucia E. Barbosa; DE ALBUQUERQUE, Dulcinéia Martins; BATISTA, Angelica Martins; et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 85–91, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000100014>

MARTIN, T. R.; ANDO, A.; TAKEISHI, T.; et al. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 151, n. 1, p. 367–376, 1993.

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

MATHERS C. D., et al. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 2, e114, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000114>

MATSUBARA, Beatriz Bojikian; ZORNOFF, Leonardo Antonio Mamede. Matriz Colágena Intersticial e sua Relação com a Expansão Miocárdica no Infarto Agudo. **Arq Bras Cardiol**, v. 64, p. 5, 1995.

MATSUDA, Nilce Mitiko; MILLER, Steven M.; EVORA, Paulo R. Barbosa. The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009001200013>

MCCABE, R. E.; MEAGHER, S. G.; MULLINS, B. T. Endogenous interferon- γ , macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Infectious Diseases**. v.163, n.4, p.912–915, 1991. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.4.912>

MEIRELLES, M. N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 175–184, 1992. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90050-T](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90050-T)

MEUSER-BATISTA, M.; CORREA, J. R.; SOARES, M. J.; et al. Isolation of cardiac mast cells in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue & Cell**, v. 40, n. 5, p. 309–316, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2008.02.006>

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

MIRANDA, Carlos H.; FIGUEIREDO, Alexandre B.; MACIEL, Benedito C.; et al. Sustained ventricular tachycardia is associated with regional myocardial sympathetic denervation assessed with 123I-metaiodobenzylguanidine in chronic Chagas cardiomyopathy. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 4, p. 504–510, 2011. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.082032>

MORILLO, Carlos A.; MARIN NETO, José Antonio; AVEZUM, Alvaro; et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas Cardiomyopathy. 2015. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/14166>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

MORILLO, Carlos A.; MARIN-NETO, Jose Antonio; AVEZUM, Alvaro; et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>

MOTT, Adam; LENORMAND, Guillaume; COSTALES, Jaime; et al. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 2, p. 315–322, 2009. <https://doi.org/10.1002/jcp.21606>

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 2, p. 301–307, 1992. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220203>

MUÑOZ-SARAVIA, Silvia Gilka; HABERLAND, Annkathrin; WALLUKAT, Gerd; et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Reviews**, v. 17, n. 1, p. 45–64, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9211-5>

MURCIA, Laura; CARRILERO, Bartolomé; MUNOZ-DAVILA, M. Jose; et al. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 4, p. 496–502, 2013. <https://doi.org/10.1093/cid/cis910>

MURRAY C. J., et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2197–223, 2012.

MURTA, A. C.; PERSECHINI, P. M.; PADRON, T. de S.; et al. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 27–38, 1990. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90127-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90127-8)

NAKAYASU, E. S. et al. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. **Proteomics**, v.9, n. 13, p. 3489–3506, July 2009. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800874>

NDE, Pius N.; SIMMONS, Kanetra J.; KLESHCHENKO, Yuliya Y.; et al. Silencing of the Laminin γ -1 Gene Blocks *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1643–1648, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1643-1648.2006>

NEIRA, Ivan; SILVA, Fernando A.; CORTEZ, Mauro; et al. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 557–561, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.557-561.2003>

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 143, n. 6, p. 1402–1420, 1976. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1402>

NOYA-RABELO, Marcia Maria; MACEDO, Carolina The; LAROCCA, Ticiana; et al. The Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: A Study Using Magnetic Resonance. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 110, n. 2, p. 124–131, 2018. <https://doi.org/10.5935/abc.20180016>

O'GARRA, Anne; VIEIRA, Paulo. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 6, p. 425–428, 2007. <https://doi.org/10.1038/nri2097>

OVERED-SAYER, C.; RAPLEY, L.; MUSTELIN, T.; CLARKE, D.L. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? **Frontiers in PHARMACOLOGY**. V. 4:174, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00174>

PAIVA, C. N.; SOUTO-PADRON, T.; COSTA, D. A.; et al. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. **Parasitology**, v. 117 (Pt 5), p. 483–490, 1998. <https://doi.org/10.1017/S0031182098003266>

PALLADINI, Giuseppina; TOZZI, Rossana; PERLINI, Stefano. Cardiac mast cells in the transition to heart failure: innocent bystanders or key actors? **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 10, p. 1823, 2003. <https://doi.org/10.1097/00004872-200310000-00007>

PARDEE, Arthur B. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 4,

p. 1286–1290, 1974. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1286>

PEREIRA, S.A.deL.; SANTOS, V.M.; RODRIGUES, D.B.R; CASTRO E.C.daC.; REIS, M.A.; TEIXEIRAS, V.P.A. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Médecine et maladies infectieuses**. V. 37, p. 229-233, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.11.013>

PÉREZ-AYALA, A; PÉREZ-MOLINA, J A; NORMAN, F; et al. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: prevalence and methods for early diagnosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 25–29, 2011. <https://doi.org/10.1179/136485910X12851868780423>

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)

PETRAY, P.; CATAÑOS-VELEZ, E.; GRISTEIN, S.; ORN, A.; ROTTENBERG, M.E. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, v. 47, p. 121-126, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(95\)00083-H](https://doi.org/10.1016/0165-2478(95)00083-H)

POSTAN, M.; CORREA, R.; FERRANS, V. J.; et al. In vitro culture of cardiac mast cells from mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 105, n. 3, p. 251–257, 1994. <https://doi.org/10.1159/000236765>

POVEDA, C. et al. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). **PLoS One**, v. 2014, n. 9, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091154>

PUPULIN, Áurea Regina Telles; BRACHT, Livia; DE OLIVEIRA DALALIO, Márcia Machado; et al. Canova medication changes TNF- α and IL-10 serum levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi* Y strain. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 860–865, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.007>

RAMÍREZ-TOLOZA, Galia; FERREIRA, Arturo. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1667, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>

RASSI, A. JR.; RASSI, A; MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem inst Oswaldo Cruz**. V.104, p. 152-158, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900021>

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

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

ROBERTSON L. J., et al. *Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 6, e0004656, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004656>

RODRIGUES, A. A. et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis, **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012b. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

RODRIGUES, A. A. et al. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain, **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 4, 2012a. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001598>

RODRIGUES, Adele A.; NOTÁRIO, Ana Flávia O.; TEIXEIRA, Thaise L.; et al. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. **Acta Tropica**, v. 157, p. 42–53, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.025>

RODRIGUES-DOS-SANTOS, Ícaro; MELO, Myllena F.; CASTRO, Liane de; et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006939, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006939>

ROFFÊ, Ester; MARINO, Ana Paula M. P.; WEAVER, Joseph; et al. *Trypanosoma cruzi* Causes Paralyzing Systemic Necrotizing Vasculitis Driven by Pathogen-Specific Type I Immunity in Mice. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 4, p. 1123–1136, 2016. <https://doi.org/10.1128/IAI.01497-15>

ROFFÊ, Ester; ROTHFUCHS, Antonio Gigliotti; SANTIAGO, Helton C.; et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 188, n. 2, p. 649–660, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003845>

ROLDÃO, J.A.; BEGHINI, M.; RAMALHO, L.S.; PORTO, C.S.; RODRIGUES, D.B.; TEIXEIRA, V.P.; DE LIMA PEREIRA, S.A. Comparison between the collagen intensity and mast cell density in the lingual muscles and myocardium of autopsied chronic chagasic and nonchagasic patients. **Parasitol Res.** V. 111, n. 2, p. 647-654, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2882-1>

ROPERT, Catherine; FERREIRA, Ludmila R. P.; CAMPOS, Marco A. S.; et al. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 1015–1025, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01609-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01609-X)

ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. **International Journal of Cardiology.** V. 66, n. 2, p. 183-194, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(98\)00208-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(98)00208-3)

ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 30, n. 3, p. 335–340, 1991. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(91\)90012-E](https://doi.org/10.1016/0167-5273(91)90012-E)

ROSSI, Marcos A.; RAMOS, Simone G.; BESTETTI, Reynaldo B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 8, p. e94-109, 2003. <https://doi.org/10.2741/948>

RUEDA, Karina; TRUJILLO, Jorge Eduardo; CARRANZA, Julio César; et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. **Biomédica**, v. 34, n. 4, p. 631–41, 2014. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2204>

RUIZ, R C; FAVORETO, S; DORTA, M L; et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochemical Journal**, v. 330, n. Pt 1, p. 505–511, 1998. <https://doi.org/10.1042/bj3300505>

SALTO, María Laura; GALLO-RODRIGUEZ, Carola; LIMA, Carlos; et al. Separation of Gal β 1→XGlcNAc and Galp β 1→XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the Alditols by High-pH Anion-Exchange Chromatography and Thin-Layer Chromatography: Characterization of Mucins from *Trypanosoma cruzi*. **Analytical Biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 79–84, 2000. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4466>

SALVATELLA, Roberto; IRABEDRA, Pilar; CASTELLANOS, Luis G. Interruption of vector transmission by native vectors and “the art of the possible”. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 122–125, 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140338>

SAMUDIO, M.; MONTENEGRO-JAMES, S.; CABRAL, M.; et al. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 119–121, 1998. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.119>

SAN FRANCISCO, Juan; BARRÍA, Iván; GUTIÉRREZ, Bessy; et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 1, p. 55–61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>

SÁNCHEZ-VALDÉZ, Fernando J; PADILLA, Angel; WANG, Wei; et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. e34039, 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.34039>

SANOJA, Cristina; CARBAJOSA, Sofía; FRESNO, Manuel; et al. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e65820, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065820>

SANTANA, R. A. G. et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon Emerging **Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, 2019.

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

SATHLER-AVELAR, Renato; VITELLI-AVELAR, Danielle Marquete; ELÓI-SANTOS, Silvana Maria; et al. Blood leukocytes from benzimidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 123, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-123>

SATO, S.; ASHRAF, M.; MILLARD, R. W.; et al. Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium: an ultrastructural study. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 261–275, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(83\)90281-X](https://doi.org/10.1016/0022-2828(83)90281-X)

SHAW, Aubie K.; KALEM, Murat C.; ZIMMER, Sara L. Mitochondrial Gene Expression Is Responsive to Starvation Stress and Developmental Transition in *Trypanosoma cruzi*. **mSphere**, v. 1, n. 2, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4894683/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00051-16>

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

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169–174, 1992. <https://doi.org/10.1084/jem.175.1.169>

SNYDER, Brandi N.; CHO, YoungJin; QIAN, Yong; et al. AFAP1L1 is a novel adaptor protein of the AFAP family that interacts with cortactin and localizes to invadosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 5, p. 376–389, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.016>

SOARES, M.J., DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v. 77, p. 461–468, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00928410>

SOLANA, María E.; FERRER, María F.; NOVOA, María Mercedes; et al. Decay-accelerating factor 1 deficiency exacerbates *Trypanosoma cruzi*-induced murine chronic myositis. **Muscle & Nerve**, v. 46, n. 4, p. 582–587, 2012. <https://doi.org/10.1002/mus.23347>

SOUSA G. R., et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e87082, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087082>

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 45–52, 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90176-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90176-X)

SOUZA, W., et al. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J Cell Biol**, v. 2010, n. 295394, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>

TAFURI W. L., RASO P. Anatomia Patológica. In: Raia AA. (ed) Manifestações digestivas da moléstia de Chagas. 1ª edição. Savier, São Paulo p.60-79, 1983.

TAMBOURGI, D. V.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D.; et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3656–3663, 1993.

TANOWITZ, Herbert B.; MACHADO, Fabiana S.; SPRAY, David C.; et al. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 13, n. 12, p. 1393–1409, 2015. <https://doi.org/10.1586/14779072.2015.1103648>

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 144, n. 2, p. 717–724, 1990.

TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A.; et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338–340, 1992. <https://doi.org/10.1038/356338a0>

TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L.; et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1820–1829, 1994.

TARLETON, Rick L. The Role of Immunology in Combating *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease. **Revista Española de Salud Pública**, p. 33–39, 2013.

TEIXEIRA, Antonio R. L.; NASCIMENTO, Rubens J.; STURM, Nancy R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463–491, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>

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

TEIXEIRA, T. L. **Papel da proteína P21 de *Trypanosoma cruzi* na inflamação e na infecção crônica experimental in vivo**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. (2018). 92f.

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

TEIXEIRA, V. de P. et al. Correlation between adrenal central vein parasitism and heart fibrosis in chronic chagasic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.56, n.2, p.177–180, February 1997. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.177>

TELLERIA, J., E TIBAYRENC, M. American Trypanosomiasis. Chagas Disease: One Hundred Years of Research. **Elsevier Inc.**, 844, 2017.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell migration. **Comprehensive Physiology**. v. 4, p. 2369 -2392, 2012. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110012>

VANRELL, María Cristina; LOSINNO, Antonella Denisse; CUETO, Juan Agustín; et al. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006049, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006049>

VARGA, J.; OLSEN, A.; HERHAL, J.; et al. Interferon- γ reverses the stimulation of collagen but not fibronectin gene expression by transforming growth factor- β in normal human fibroblasts. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 20, n. 5, p. 487–493, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1990.tb01915.x>

VENTURA-GARCIA, Laia; ROURA, Maria; PELL, Christopher; et al. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 9, p. e2410, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002410>

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

VIDAL, J.C., et al. Loss of the cytostome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J. Struct. Biol**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.018>

VILELA, J. E. R. Relação da angiogênese e da densidade de mastócitos com a fibrose miocárdica em idosos com cardiopatia chagásica crônica. 2015. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

VILLALTA, F.; SMITH, C. M.; RUIZ-RUANO, A.; et al. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS letters**, v. 505, n. 3, p. 383–388, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02853-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02853-8)

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; et al. 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: MCBRC**, v. 2, n. 1, p. 64–70, 1999. <https://doi.org/10.1006/mcbr.1999.0150>

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; et al. 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: MCBRC**, v. 2, n. 1, p. 64–70, 1999. <https://doi.org/10.1006/mcbr.1999.0150>

VIZCAÍNO-CASTILLO, Andrea; JIMÉNEZ-MARÍN, Andrea; ESPINOZA, Bertha. **Exacerbated Skeletal Muscle Inflammation and Calcification in the Acute Phase of Infection**

by **Mexican *Trypanosoma cruzi* DTUI Strain**. BioMed Research International. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/450389/>>. Acesso em: 2 jun. 2019. <https://doi.org/10.1155/2014/450389>

VOS T., et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p.743–800, 2015.

WATANABE COSTA, Renata; DA SILVEIRA, Jose F.; BAHIA, Diana. Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 388, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00388>

WOOLSEY, Aaron M.; BURLEIGH, Barbara A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 829–838, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x>

World Health Organization (WHO) The World Health Report 2016: Chagas disease. **World Health Organization**, 2019.

XAVIER, S. C. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, e2878, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002878>

YAMAGATA, Yoichi; NAKAGAWA, Jun. Control of Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 61, p. 129–165, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61004-4](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61004-4)

ZANNAD, Faiez; ROSSIGNOL, Patrick; IRAQI, Wafae. Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 15, n. 4, p. 319–329, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10741-009-9143-0>

ZHAO, Yongdong; URGANUS, Annette L.; SPEVAK, Lyudmila; et al. Characterization of dystrophic calcification induced in mice by cardiotoxin. **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 3, p. 267–275, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00223-009-9271-5>

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433–439, 2000. <https://doi.org/10.1038/35044005>

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

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. v.12, n.2, p.240–253, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

ANEXO I

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 005/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 087/15

Projeto Pesquisa: “Triagem de peptídeos sintéticos baseados na sequência da rP21 que detenham suas características biológicas”.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. 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, 06 de janeiro de 2016.

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