

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

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PROTEÍNA MIOSINA-1 E DO RECEPTOR  
DECTINA-1 NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

**Mylla Spirandelli da Costa**

**Uberlândia – MG  
Setembro – 2020**

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

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PROTEÍNA MIOSINA-1 E DO RECEPTOR  
DECTINA-1 NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

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

**Mylla Spirandelli da Costa  
Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva  
Coorientadora: Thaise Lara Teixeira**

**Uberlândia – MG  
Setembro – 2020**

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

C837 2020	<p>Costa, Mylla Spirandelli da, 1992- PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PROTEÍNA MIOSINA-1 E DO RECEPTOR DECTINA-1 NA INFECÇÃO IN VITRO POR TRYPANOSOMA CRUZI [recurso eletrônico] / Mylla Spirandelli da Costa. - 2020.</p> <p>Orientadora: Claudio Vieira da Silva. Coorientadora: Thaise Lara Teixeira. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.711">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.711</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Silva, Claudio Vieira da ,1972-, (Orient.). II. Teixeira, Thaise Lara ,1987-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada  
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 135 do PPIPA				
Data:	dezesesseis de outubro de dois mil e vinte	Hora de início:	13h30min	Hora de encerramento:	19horas
Matrícula do Discente:	11623IPA004				
Nome do Discente:	Mylla Spirandelli da Costa				
Título do Trabalho:	Propriedades biológicas da proteína Miosina-1 e do receptor Dectina-1 na infecção in vitro por <i>Trypanosoma cruzi</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de patógenos causadores de doenças infecciosas e parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo de componentes das células hospedeiras e de parasitas associados à invasão celular, tráfego e sinalização intracelular durante a infecção experimental por <i>trypanosoma cruzi</i> e <i>leishmania</i>				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Thiago Souza Onofre - Pós Doutorando/UNIFESP; Angelica de Oliveira Gomes- UFTM/MG; Bruna Cristina Borges – ICBIM/UFU; Wania Rezende Lima – UFCAT e Claudio Vieira da Silva - ICBIM/UFU (Presidente) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**Aprovado(a).**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/10/2020, às 18:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wania Rezende Lima, Usuário Externo**, em 16/10/2020, às 18:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 16/10/2020, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Cristina Borges, Usuário Externo**, em 16/10/2020, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Souza Onofre, Usuário Externo**, em 16/10/2020, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2285748** e o código CRC **8E0AAB6F**.

“A lei da mente é implacável.  
O que você pensa, você cria;  
O que você sente, você atrai;  
O que você acredita  
Torna-se realidade.”

Sidarta Gautama (Buddha)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu melhor amigo, por ter me dado condições de lutar e oportunidades de alcançar os objetivos pretendidos, por me erguer quando tudo parecia perdido e nunca desistir de mim;

À minha mãe, por ser minha companheira e principal incentivadora, obrigada por sempre acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava;

Ao meu namorado Murilo, pela compreensão, paciência e por sempre acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva por prontamente ter me aceitado como sua aluna e permitido que eu aprendesse tantas coisas novas durante meu doutorado. Por participar ativamente do meu processo de aprendizado com valiosos conselhos e ideias, você é brilhante;

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Tripanosomatídeos Júlia, Bruna, Isabella, Rayane, Aline, Thaise, Rafael, Samuel, Flávia, Anna Clara e Cassiano pelos conhecimentos compartilhados e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e os momentos difíceis mais confortáveis;

Aos animais utilizados, pela vida doada para os experimentos, sem eles esse trabalho não existiria;

Às agências financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste trabalho e pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Anti-CD184: Anticorpo CD184
- ASM: Esfingomielinase ácida
- ATP: Trifosfato de adenosina
- BnSP-7: Fosfolipase A2 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*
- C2C12: Mioblasto murino
- C3: Componente 3 do sistema complemento
- Ca<sup>2+</sup>: Cálcio extracelular
- CCC: Cardiomiopatia chagásica crônica
- CHMP4B: *Charged multivesicular body protein 4b*
- CLEC-7A: *C-Type Lectin Domain Containing 7A*
- CXCR4: Receptor de quimiocinas CXCR4
- DHEA: Deidroepiandrosterona
- DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DO: Densidade ótica
- ECG: Eletrocardiograma
- ESCRT: *Endosomal sorting complex required for transport*
- FITC: *Fluorescein isothiocyanate*
- gp35/50: Glicoproteína 35/50 de *T. cruzi*
- gp57/51: Glicoproteína 57/51 de *T. cruzi*
- gp58/068: Glicoproteína 58/068 de *T. cruzi*
- gp82: Glicoproteína 82 de *T. cruzi*
- gp85: Glicoproteína 85 de *T. cruzi*
- gp90: Glicoproteína 90 de *T. cruzi*
- gp160: Glicoproteína 160 de *T. cruzi*
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol
- HEPES: Ácido hidroxietil piperazinoetanossulfônico
- HIV: Vírus da imunodeficiência humana
- HUVEC: Células endoteliais vasculares humanas
- IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória média
- IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$
- IgG: Imunoglobulina G

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

IL-22: Interleucina 22

IL-33: Interleucina 33

ILV - Vesículas intraluminais

IPTG - *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

LAMP-1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*

LAMP-2: *Lysosomal-associated membrane protein 2*

LB: Meio Luria-Bertani

MVBs: Corpos multivesiculares

NK: Células *Natural Killer*

NLRP3: *Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR) and pyrin domain containing receptor 3*

NO: Óxido nítrico

P21: Proteína 21 de *T. cruzi*

PBS: Solução salina

PCLP: Pentacloropseudilina

PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase

PIP2: Fosfatidilinositol (4,5) -bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PPD: Parafenilenodiamina

RIFI: Reação de imunofluorescência

rP21: Proteína 21 de *T. cruzi* recombinante

SAP: Proteínas ricas em serina, alanina e prolina

SFB: Soro fetal bovino

SNC: Sistema nervoso central

*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*

*T. infestans*: *Triatoma infestans*

Tbet: *T-box transcription factor*

Tc-85: Proteína 85 de *T. cruzi*

TCT: Tripomastigota de cultura celular

TcTLE - Peptídeo da proteína 11 da membrana do cinetoplasto

Tc-Tox: Peptídeo de *T. cruzi* que tem homologia com o fator 9 do complemento

TCTY: Tripomastigota de cultura celular da cepa Y

Th1: Célula T helper 1

Th2: Célula T helper 2

Th9: Célula T helper 9

Th17: Células T helper 17

TLR2: *Toll like receptor 2*

TLR4: *Toll like receptor 4*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRITC: Tetrametilrodamina

WT: *wild type*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
Figura 3. <i>Triatoma infestans</i> .....	24
Figura 4. PCLP não é tóxico para C2C12 e <i>T. cruzi</i> .....	48
Figura 5. A inibição de miosina-1 em <i>T. cruzi</i> compromete a distância percorrida pelo parasita.....	50
Figura 6. Adesão de <i>T. cruzi</i> em células C2C12 é prejudicada pelo tratamento com PCLP.....	51
Figura 7. O bloqueio de Miosina-1 em <i>T. cruzi</i> reduz o número de células com parasitas aderidos e o número de parasitas totais.....	52
Figura 8. <i>T. cruzi</i> tratado com PCLP reduz o perfil de adesão no ensaio de Giemsa.....	53
Figura 9. O tratamento com a proteína recombinante 21 de <i>T. cruzi</i> retoma o perfil de invasão prejudicado pelo bloqueio de miosina-1.....	55
Figura 10. A longo prazo PCLP ainda é capaz e interferir no processo de infecção.....	56
Figura 11. Inibição de Miosina-1 é cumulativa em tratamento duplo.....	58
Figura 12. Tratamento duplo de <i>T. cruzi</i> e C2C12 com PCLP prejudica o processo de invasão.....	59
Figura 13. Cinética de lisossomos é prejudicada após do tratamento de C2C12 com PCLP.....	61
Figura 14. A área de lisossomos recrutados é menor em mioblastos tratados com PCLP.....	62
Figura 15. Colocalização de CHMP4B com <i>T. cruzi</i> durante a cinética de invasão.....	63
Figura 16. A superexpressão de CHMP4B e inibição de miosina-1 simultaneamente dificultam a entrada de <i>T. cruzi</i> em C2C12.....	65
Figura 17. A ausência de Dectina-1 prejudica o processo de invasão por <i>T. cruzi</i> .....	68
Figura 18. Receptor Dectina-1 tem impacto significativo no processo de invasão por <i>T. cruzi</i> em macrófagos.....	69
Figura 19. A multiplicação de amastigotas de <i>T. cruzi</i> fica prejudicada a partir de 48 horas de infecção.....	70
Figura 20. Amastigotas de <i>T. cruzi</i> tem replicação diminuída em macrófagos Dectina-1 <sup>-/-</sup> .....	71
Figura 21. rP21 retoma o processo de invasão perdido pela ausência de Dectina-1.....	72

Figura 22. Macrófagos Dectina-1 <sup>-/-</sup> apresentam maior expressão de CXCR4.....	73
Figura 23. A ausência de Dectina-1 está diretamente relacionada com o aumento da expressão de CXCR4.....	74

**LISTA DE VÍDEO**

Vídeo 1 – A inibição de miosina-1 compromete a motilidade de *T. cruzi*.....49

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE VÍDEO.....</b>	<b>10</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>18</b>
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
1.1.1. Histórico.....	18
1.1.2. Ciclo de vida.....	18
1.1.3. Doença de Chagas.....	21
1.1.4. Epidemiologia.....	22
1.1.5. Mecanismo de interação parasito-hospedeiro.....	24
1.1.6. Sistema Imune.....	26
1.1.7. Mecanismos de invasão celular.....	27
1.1.8. Tratamento da Doença de Chagas.....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1. Local de estudo.....	33
4.2. Cultura de células.....	33
4.3. Cultura de parasitos.....	33
4.4. Animais.....	33
4.5. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	34
4.6. Síntese de Pentacloropseudilina (PCLP).....	34
4.7. Purificação de rP21.....	34
4.8. Viabilidade celular de <i>T. cruzi</i> e C2C12.....	35
4.9. Ensaio de motilidade.....	36
4.10. Ensaio de aderência na superfície celular.....	37
4.11. Ensaio de invasão.....	37
4.12. Ensaio de multiplicação.....	41

4.13.	Cinética de lisossomos.....	42
4.14.	Superexpressão de CHMP4B.....	42
4.15.	Expressão de CXCR4.....	43
<b>CAPÍTULO 1.....</b>		<b>44</b>
<b>5. INTRODUÇÃO.....</b>		<b>45</b>
5.1.	Miosina.....	45
5.1.1.	Células humanas.....	45
5.1.2.	<i>T. cruzi</i> .....	45
5.2.	Motilidade.....	46
5.3.	Pentacloropseudilina.....	47
5.4.	<i>Charged Multivesicular Body Protein 4B</i> .....	47
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		<b>48</b>
6.1.	PCLP não é citotóxico nem para mioblastos murinos e nem para <i>T. cruzi</i> .....	48
6.2.	A inibição da miosina-1 de <i>T. cruzi</i> reduz motilidade do parasita.....	49
6.3.	Miosina-1 está diretamente ligada à capacidade de <i>T. cruzi</i> em aderir à célula.....	51
6.4.	rP21 de <i>T. cruzi</i> restaura a capacidade infectiva do parasita quando o parasito é tratado com PCLP.....	54
6.5.	A inibição da miosina de <i>T. cruzi</i> influencia tardiamente no processo de multiplicação.....	56
6.6.	Processo de invasão celular por <i>T. cruzi</i> é prejudicado com a inibição de miosina do parasita e da célula.....	57
6.7.	Infecção por <i>T. cruzi</i> é menor em mioblastos murinos tratados com PCLP devido ao seu delivery de lisossomos estar prejudicado.....	60
6.8.	A superexpressão de CHMP4B interfere no processo de invasão de <i>T. cruzi</i> .....	63
6.9.	A inibição da miosina intensifica o efeito da superexpressão de CHMP4B na invasão por <i>T. cruzi</i> .....	64
<b>CAPÍTULO 2.....</b>		<b>66</b>
<b>7. INTRODUÇÃO.....</b>		<b>67</b>
7.1.	Dectina-1.....	67
<b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		<b>68</b>
8.1.	Dectina-1 apresenta um papel fundamental na invasão de <i>T. cruzi</i> .....	68
8.2.	A ausência de Dectina-1 prejudica o processo de multiplicação intracelular de <i>T. cruzi</i> .....	69

8.3. rP21 de <i>T. cruzi</i> retoma o processo de invasão em macrófagos deficientes para Dectina-1.....	72
8.4. CXCR4 como um mecanismo compensatório da falta de Dectina-1.....	73
<b>9. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO I - Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal.....</b>	<b>90</b>

## Resumo

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas, pertencente ao grupo Kinetoplastida. Possui três principais formas evolutivas: tripomastigotas (formas infectivas), amastigotas e epimastigotas (formas replicativas no hospedeiro definitivo e no inseto vetor, respectivamente). Miosinas são proteínas motoras presentes nas células de mamíferos e também em *T. cruzi*. Nas células possuem diversas funções como fagocitose, citocinese, transdução de sinal e tráfego de organelas e partículas, e no músculo esquelético está diretamente relacionada com a contração muscular. Em kinetoplastidas, participa de processos de tráfego de vesículas intraparasitária e da montagem flagelar. Pentacloropseudilina (PCLP) é um inibidor da miosina do tipo 1, pertencente tanto em células quanto no parasita. *T. cruzi* utiliza-se de receptores, como CXCR4 e bradicinina para obter sucesso em seus mecanismos de invasão. Dectina-1 é um receptor lectínico e tem se mostrado importante em doenças relevantes como micoses, colites, obesidade, hepatite alcoólica, alergias e oncogenes. Além da sua capacidade de se ligar a  $\beta$ -glucanos, também se ligam a troponina, *Mycobacterium*, *Leishmania*, galectina e imunoglobulinas galactosiladas. O objetivo desse trabalho foi investigar o papel da miosina-1 de *T. cruzi* e de mioblastos murinos (C2C12) e do receptor Dectina-1 em macrófagos durante o processo de infecção por *T. cruzi*. No primeiro capítulo, avaliamos a motilidade, capacidade de aderência em C2C12, capacidade de multiplicação de amastigotas intracelulares, capacidade de liberar proteínas secretadas e a capacidade de invasão celular de *T. cruzi* após o bloqueio com PCLP. Para avaliar a miosina celular, além do bloqueio e avaliação do processo de invasão celular por *T. cruzi*, foi avaliado o tráfego intracelular de lisossomos e o papel de CHMP4B, envolvido na formação de corpos multivesiculares (MVBs). Vimos inicialmente que o PCLP não foi tóxico nem para *T. cruzi*, nem para C2C12, porém a inibição da miosina-1 do parasita alterou a sua motilidade e a distância percorrida por ele, sua capacidade de adesão à célula hospedeira ficou comprometida assim como sua capacidade de invadi-las. Ao biodisponibilizar rP21 para *T. cruzi* com a miosina-1 bloqueada no momento da invasão, esse processo é retomado, sugerindo a possibilidade dessa proteína não estar sendo secretada como deveria. Além disso, a capacidade de multiplicação intracelular desse parasita fica comprometida após 72 horas. Quando a miosina-1 de C2C12 é inibida, o processo de invasão por *T. cruzi* também fica comprometido devido ao tráfego intracelular estar prejudicado, principalmente de lisossomos. CHMP4B também interfere no processo de invasão do parasita e é potencializado quando bloqueamos a miosina-1 de células que superexpressam essa molécula. Portanto, miosina-1 tanto do parasita quanto da célula têm um papel fundamental

na progressão de infecção por *T. cruzi*. No segundo capítulo, realizamos ensaios de invasão, multiplicação e investigamos a relação de rP21 com Dectina-1. Vimos que o receptor é importante para o sucesso da infecção por *T. cruzi*, pois na sua ausência os processos de invasão e multiplicação ficam defasados, além disso vimos que ao biodisponibilizar rP21 para os parasitos durante o processo de invasão, o índice é retomado ao nível de células WT, ao investigarmos mais a fundo, vimos que isso foi possível devido à alta expressão de CXCR4 em células *knockout*, sugerindo um mecanismo compensatório na ausência de Dectina-1. Ainda são necessários estudos complementares para entender o mecanismo celular como um todo, mas de modo geral conseguimos ver que Dectina-1 está participando diretamente do processo de invasão celular e multiplicação por *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, Miosina-1, pentacloropseudilina, CHMP4B, Dectina-1 e CXCR4.

## **Abstract**

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is the etiologic agent of Chagas disease, belonging to Kinetoplastida group. It has three main evolutionary forms: trypomastigotes (infectious forms), amastigotes and epimastigotes (replicative forms in definitive host and vector insect, respectively). Myosins are motor proteins present in mammal cells and also in *T. cruzi*. In cells, they have several functions: phagocytosis, cytokinesis, signal transduction and organelles and particles traffic, and skeletal muscle is directly related to muscle contraction. In kinetoplastids, it participates in intraparasitic vesicle trafficking and flagellar assembly processes. Pentachloropseudilin (PCLP) is an inhibitor of type 1 myosin, belonging to both cells and the parasite. *T. cruzi* uses receptors, such as CXCR4 and bradykinin to obtain success in its invasion mechanisms. Dectin-1 is a lectin receptor and has been shown to be important in relevant diseases such as mycoses, colitis, obesity, alcoholic hepatitis, allergies and oncogenes. In addition to their ability to bind  $\beta$ -glucans, they also bind to troponin, *Mycobacterium*, *Leishmania*, galectin and galactosylated immunoglobulins. The aim of this work was investigate the role of *T. cruzi* and murine myoblasts (C2C12) myosin-1 and Dectin-1 receptor in macrophages during invasion process by *T. cruzi*. In the first chapter, we evaluated motility, ability to adhere to C2C12, ability to intracellular amastigotes multiply, ability to release secreted proteins, and capacity for *T. cruzi* after blocking with PCLP of cellular invasion. To assess cellular myosin, in addition to blocking and assessing the processes of cellular invasion by *T. cruzi*, intracellular lysosome traffic and CHMP4B role, involved in the formation of multivesicular bodies (MVBs), were evaluated. We initially observe that PCLP was not toxic to either *T. cruzi* or C2C12, but parasite myosin-1 inhibition altered its motility and the distance traveled by it, its ability to adhere to host cell, as well as its ability to invade them. By making rP21 available for *T. cruzi* with myosin-1 blocked at the time of invasion, this process is resumed, suggesting the possibility that this protein is not being secreted as it should. In addition, parasite intracellular multiplication capacity is compromised after 72 hours. When C2C12 myosin-1 is inhibited, invasion process by *T. cruzi* is also compromised due to impaired intracellular traffic, mainly of lysosomes. CHMP4B also interferes with parasite invasion process and is potentiated when we block myosin-1 from cells overexpressing this molecule. Therefore, myosin-1 from both parasite and cell has a fundamental role in infection progression by *T. cruzi*. In the second chapter, we performed invasion, multiplication assay and investigated rP21 relationship with Dectin-1. We observe that this receptor is important for *T. cruzi* infection success, because in its absence invasion and multiplication processes are outdated, in addition we saw that when make rP21 available for parasites during invasion process, the index is

resumed to WT cells level, upon further investigation, we observe that this was possible due to high expression of CXCR4 in knockout cells, suggesting a compensatory mechanism in absence of Dectin-1. Complementary studies are still needed to understand cellular mechanisms, but in general we can conclude that Dectin-1 is directly participating in cell invasion and multiplication process by *T. cruzi*.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Myosin-1, pentachloropseudiline, CHMP4B, Dectin-1 and CXCR4.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. *Trypanosoma cruzi*

#### 1.1.1. Histórico

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas e foi descoberto em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Em tal ocasião, ele não descobriu apenas o vetor (o inseto *Triatoma infestans*), mas também o agente etiológico (o protozoário *T. cruzi*) e o ciclo de vida da doença de Chagas (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

*T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Nesta família encontramos protozoários mono ou biflagelares, os flagelos se originam a partir de um orifício chamado bolsa flagelar. Além da bolsa flagelar, outra estrutura característica dessa família é o cinetoplasto, uma região que concentra o DNA mitocondrial (VOTÝPKA et al., 2015).

O gênero *Trypanosoma* inclui importantes espécies causadoras de doenças humanas importantes, como o *T. cruzi*, agente da doença de Chagas (ou Tripanossomíase americana), *T. rhodesiense* e *T. gambiense*, agentes causadores da doença do sono. Esse gênero foi dividido em dois grupos: salivaria - inclui tripanosomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo do hospedeiro intermediário e que posteriormente atravessam o epitélio digestivo e atingem as glândulas salivares onde podemos encontrar as formas infectantes que são inoculadas mecanicamente; e o stercoraria, grupo a qual pertence *T. cruzi* - inclui tripanosomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectantes pelas fezes (SOUZA; VIDAL, 2017).

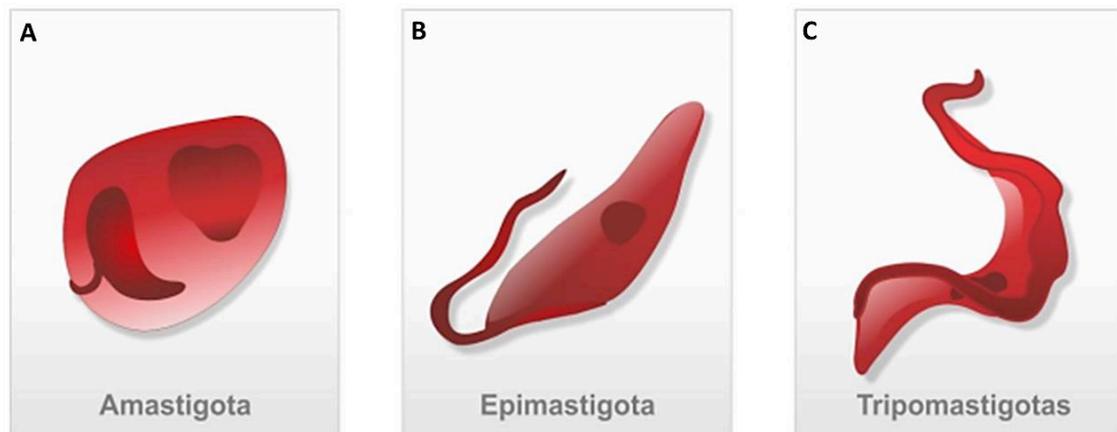
O subgênero de *T. cruzi* é o Schizotrypanum, na qual estão alocados protozoários que possuem um desenvolvimento intracelular, chamadas de formas amastigotas. Essas formas se multiplicam no interior de células hospedeiras. Além de *T. cruzi*, também fazem parte desses subgêneros *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, *T. myoti*, *T. erneyi* e *T. herthameyeri*, esses *Trypanosomas* infectam morcegos do velho e do novo mundo (SOUZA; VIDAL, 2017a; SANTOS et al., 2019).

#### 1.1.2. Ciclo de vida

*T. cruzi* tem capacidade de infectar mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes, tais como: seres humanos, animais silvestres e animais domésticos. Mas também infectam

invertebrados, a exemplo dos insetos vetores (triatomíneos). Esse parasita exibe alta plasticidade morfológica e funcional, variando entre diferentes estágios chamados de replicativos e/ou não replicativos e infectantes (AZAMBUJA; GARCIA, 2017).

Entre as formas replicativas inclui-se as formas epimastigotas – presentes no tubo digestivo dos triatomíneos; e as amastigotas - observados no interior das células de mamíferos. As formas não replicativas e infectantes incluem os tripomastigotas metacíclicos - encontrados nas fezes e urina do inseto vetor; e os tripomastigotas circulantes – observado no sangue periférico de mamíferos. Portanto, o *T. cruzi* consegue além de sobreviver, se multiplicar dentro das células hospedeiras de mamíferos (BATISTA et al., 2020; RAMIREZ-BARRIOS et al., 2020) (**Figura 1**).



**Figura 1. Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.** (A) Amastigota; (B) Epimastigota e (C) Tripomastigota. **Fonte:** Paula Cristina Brígido.

No sangue periférico dos hospedeiros mamíferos estão os tripomastigotas de *T. cruzi* e consequentemente, o inseto triatomíneo ingere essas formas durante o repasto sanguíneo (ANDREWS et al., 1987; LEY et al., 1988). Os parasitas passam para o intestino do vetor e os tripomastigotas sofrem diferenciação, no ambiente do intestino médio e transformam-se em epimastigotas, que são formas replicativas (TYLER; ENGMAN, 2001).

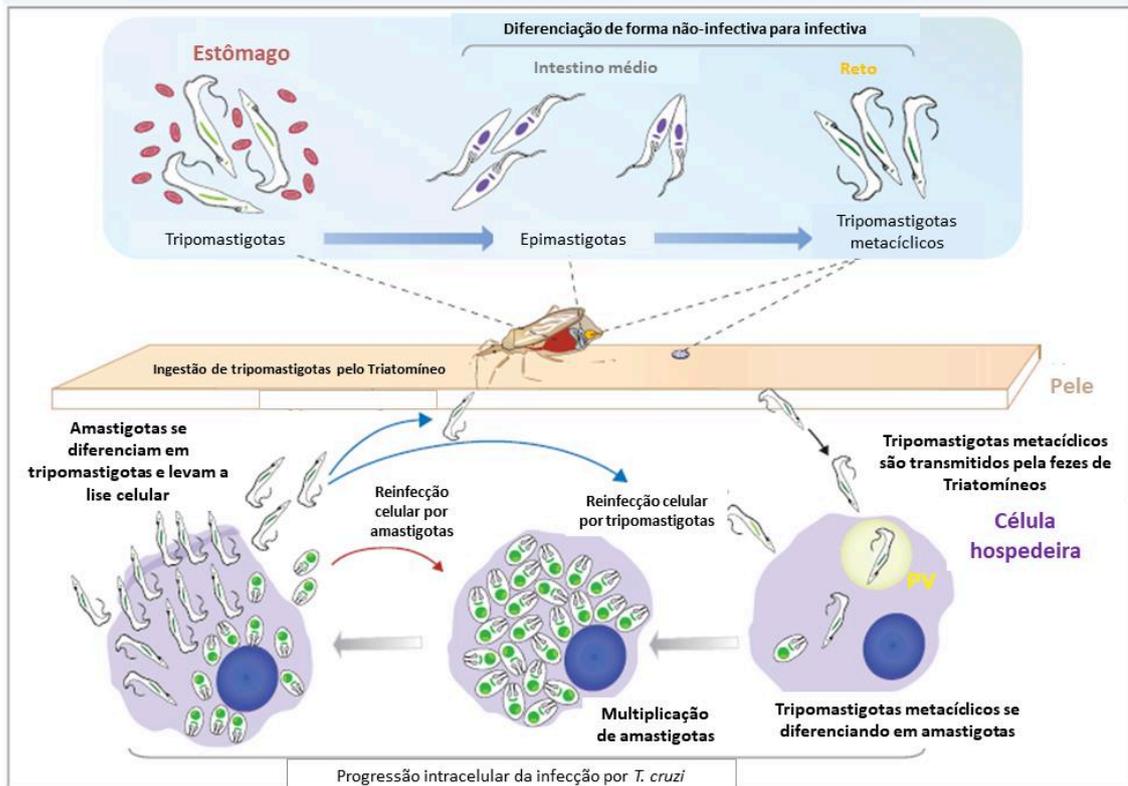
Epimastigotas se ligam hidrofobicamente à cutícula cerosa da parede posterior do intestino antes de se diferenciar em formas metacíclicas (BONALDO et al., 1988). Uma vez formados, os metacíclicos se desprendem da cutícula cerosa e são excretadas nas fezes do vetor. A contaminação da ferida causada pela picada do triatomíneo ou da membrana mucosa do hospedeiro mamífero com essas fezes, leva à infecção (MELO et al., 2020).

De acordo com o Ministério da saúde (2019a), as principais formas de transmissão da doença de Chagas são: vetorial - contato com fezes de triatomíneos infectados, após picada/repasto (os triatomíneos são insetos popularmente conhecidos como barbeiro, chupão,

procotó ou bicudo); oral - ingestão de alimentos contaminados com parasitos provenientes de triatomíneos infectados (açai, cana de açúcar, etc); vertical - ocorre pela passagem de parasitos de mulheres infectadas por *T. cruzi* para seus bebês durante a gravidez ou o parto; transfusão de sangue ou transplante de órgãos de doadores infectados a receptores saudios; e acidental: pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado durante manipulação em laboratório ou na manipulação de caça.

Os tripomastigotas metacíclicos são capazes de parasitar uma ampla variedade de células de mamíferos nucleadas. A invasão pode ocorrer por mecanismos distintos: remodelamento do citoesqueleto, fagocitose do parasita e reparo de membrana plasmática. De uma forma geral há formação de um compartimento vacuolar, permitindo a entrada do parasita (RODRIGUEZ et al., 1997). A acidificação do vacúolo parasitóforo resultante da fusão com os lisossomos e também serve para ativar uma molécula semelhante a porina secretada pelo parasita, chamada de Tc-Tox, que facilita a sua saída do vacúolo. O tripomastigota escapa do vacúolo e se diferencia na forma amastigota, que é uma forma replicativa, portanto prolifera no citoplasma celular (ANDREWS, 1993; ANDRADE; ANDREWS, 2004). Em alta densidade, os amastigotas dão origem a tripomastigotas. Uma vez formados, os tripomastigotas geralmente rompem a membrana plasmática com seus constantes movimentos em chicote e escapam para a circulação sanguínea, podendo invadir novas células. Tripomastigotas sanguíneos são fontes de contaminação para novos triatomíneos, continuando o ciclo (TYLER; ENGMAN, 2001) **(Figura 2)**.

Podem ser encontradas formas amastigotas sanguíneas (ou extracelulares), essas formas também tem capacidade de propagar a infecção, pois são capazes de infectar células, particularmente células fagocíticas, embora por um mecanismo diferente dos tripomastigotas (RODRIGUES et al., 2019).



**Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** A transmissão ocorre principalmente por insetos triatomíneos durante o repasto sanguíneo. Tripomastigotas metacíclicas liberados nas fezes durante o repasto sanguíneo de insetos entram no hospedeiro mamífero através de feridas na pele ou membranas mucosas e invadem as células circundantes. Após a invasão celular, os tripomastigotas metacíclicos são contidos dentro de um vacúolo parasitóforo (VP), de onde escapam, se transformam em amastigotas e multiplicam no citosol. Posteriormente, após a divisão binária, os amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas altamente móveis que são liberadas após a lise celular. Eles podem infectar células vizinhas, migrar para diferentes tecidos ou serem ingeridos por um novo inseto vetor. **Fonte:** Moretti et al., 2020 (adaptado).

### 1.1.3. Doença de Chagas

A Doença de Chagas apresenta duas fases distintas, sendo elas: aguda e crônica. O prognóstico e sintomas para essas fases é diferente, sendo a fase aguda mais leve, na qual a pessoa pode apresentar sinais moderados ou até ser assintomática, enquanto na fase crônica existem complicações mais sérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b).

Quando a infecção ocorre através da pele acontece uma inflamação local intensa chamada de chagoma de inoculação e quando ocorre na mucosa ocular, também ocorre uma inflamação intensa e/ou 2 meses de conjuntivite uniocular, esse sintoma é conhecido como sinal de Romaña. (NGUYEN; WASEEM, 2020).

A fase aguda dura de 8-12 semanas após a infecção e é caracterizada pela presença de tripomastigotas circulantes no sangue periférico. Os principais sintomas são: febre prolongada (mais de 7 dias), dor de cabeça, fraqueza intensa, inchaço no rosto e pernas. E as alterações

fisiológicas encontradas nesse período são: edema, linfadenopatia, anemia, hepatoesplenomegalia, anormalidades no eletrocardiograma (ECG), envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e morte (NGUYEN & WASEEM, 2020).

A forma conhecida como indeterminada ocorre em indivíduos que não apresentam nenhuma sintomatologia ou alteração fisiológica, ou seja, assintomática independente do tempo pós infecção (NGUYEN; WASEEM, 2020).

A fase crônica geralmente começa com uma forma indeterminada nos primeiros 10-30 anos da fase, onde o paciente terá sorologia positiva, mas será assintomático. Eventualmente a doença progride e cerca de 30% dos pacientes podem apresentar comprometimento cardíaco, quadros de febre, cardiomegalia, aneurismas apicais e/ou anormalidades no ECG. Enquanto, 10% dos pacientes podem ter problemas gastrointestinais, caracterizado por: febre, megaesôfago, megacólon devido à destruição do plexo mioentérico e constipação (VIEIRA et al., 2019).

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é uma das principais formas de evolução da doença de Chagas, a forma mais comum e grave de CCC pode estar relacionada a anormalidades ventriculares, como insuficiência cardíaca, arritmias, bloqueios cardíacos, eventos tromboembólicos e morte súbita. Devido a hipertrofia e dilatação generalizada do coração, além disso esse órgão se torna cronicamente fibrosado e com áreas locais necróticas (RASSI et al., 2010).

#### **1.1.4. Epidemiologia**

A doença de Chagas afeta de 8 a 10 milhões de pessoas no mundo (MANNE-GOEHLER et al., 2016). 15 gêneros de triatomíneo diferentes transmitem *T. cruzi* e cerca de 30 a 60% desses insetos possuem o protozoário (WHO, 2020). Portanto, o controle de vetores é uma medida efetiva na redução da doença de chagas em países da América do Sul (DORN et al., 2003).

Na América Central, 11% da população está infectada (aproximadamente 2 milhões de pessoas) e 26 milhões estão em condição de risco. (MONCAYO et al., 2009). Existe um aumento no quadro de doença de Chagas na América do Norte, relacionado a imigrantes portadores da doença vindos da América Central em busca de melhores condições de vida (normalmente provindos de El Salvador, Guatemala e Honduras). A prevalência nos Estados Unidos é de 250 a 300.000 doentes, sem incluir imigrantes sem documentos legais. (BERN et al., 2009).

No passado, a área com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil, conhecida no final dos anos 70, incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos e destes 711 com presença do *T. infestans* (**Figura 3**), principal vetor estritamente domiciliar no Brasil. Ações sistematizadas de controle químico foram instituídas a partir de 1975, e desde então levaram a uma expressiva redução da presença de *T. infestans* e, simultaneamente, da sua transmissão ao homem. Em reconhecimento, o Brasil recebeu em 2006 a certificação internacional de interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans*, concedida pela Organização Panamericana da Saúde e Organização Mundial da Saúde. No entanto, a estimativa é que haja, pelo menos, 12 milhões de portadores da doença crônica nas Américas e no Brasil cerca de um milhão de pessoas infectadas. Apesar desses dados, o risco de transmissão vetorial da Doença de Chagas ainda existe por alguns fatores: existência de espécies autóctones de triatomíneos com elevado potencial de colonização, presença de reservatórios de *T. cruzi* e da aproximação cada vez mais frequente das populações humanas a esses ambientes, persistência de focos residuais de *T. infestans* ainda existentes em alguns municípios dos estados da Bahia e Rio Grande do Sul. A certificação não deve interromper os investimentos no controle da doença, no tratamento dos portadores da forma crônica do Chagas e na rápida detecção e controle de surtos episódicos de transmissão oral (ou alimentar), como o surto associado ao consumo de caldo-de-cana ocorrido em 2005, em Santa Catarina ou em 2019, na qual Pernambuco registrou o maior surto de fase aguda de Doença de Chagas da sua história, totalizando mais de 20 casos confirmados. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

Atualmente, há pelo menos um milhão de pessoas infectadas por *T. cruzi* no Brasil. Existe uma prevalência de 12% da sua população rural sendo portadora da doença de Chagas, normalmente são homens trabalhadores rurais com idade média de 55 anos, baixo grau de escolaridade e que vivem na zona rural. Enquanto na área urbana a prevalência é de 4,2%, mas é importante ressaltar que a maioria dessas pessoas que atualmente vivem em área urbana, já viveram na área rural (FREITAS et al., 2017).



**Figura 3.** *Triatoma infestans*. Visão dorsal do vetor da doença de Chagas. **Fonte:** Schaefer; Coscarón (2001).

A doença de Chagas sempre será muito relevante no Brasil, ainda que a ocorrência de novos casos tenha diminuído, representa uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias. Em estudos recentes as estimativas de prevalência variaram de 1,0 a 2,4% da população, o equivalente a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

Casas de pau-a-pique são a imagem da epidemiologia da doença de Chagas e é na fresta dessas casas que o triatomíneo se esconde durante o dia e realiza o repasto sanguíneo durante a noite. Fazem parte das medidas de profilaxia, o controle de vetores a partir da eliminação desse tipo de construção. Por isso, a alguns anos houve redução desse tipo de casas, o número de casos de doença de Chagas também foi reduzido e como consequência, as pessoas que atualmente apresentam a doença possuem acima de 50 anos, em geral (MILLS, 2020).

Outro quadro de surtos de transmissão está relacionado a transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros). Entre o período de 2008 a 2017, foram registrados casos confirmados de doença de Chagas aguda na maioria dos estados brasileiros. Entretanto, cerca de 95% concentra-se na região Norte. Em relação às principais formas prováveis de transmissão ocorridas no país, 72% foram por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e em 18% não foram identificadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

### **1.1.5. Mecanismo de interação parasita-hospedeiro**

*T. cruzi* possui moléculas de superfície e secretadas que auxiliam em seu processo de adesão, invasão e replicação. Elas interagem com a célula hospedeira, permitindo a continuidade do ciclo de vida e se diferem dentre as formas evolutivas do parasita.

A maioria das glicoproteínas de superfície com propriedades de adesão celular são ancoradas ao parasita por glicosilfosfatidilinositol (GPI), cujo domínio N-terminal externo e variável está localizado no glicocálice, facilitando a conexão com vários constituintes da membrana celular hospedeira e da matriz extracelular (CARVALHO; BARRIAS, 2017).

Tripomastigotas metacíclicos possuem: gp82 – é uma glicoproteína de superfície envolvida no processo de adesão, na mobilização de cálcio intracelular para auxiliar no processo de invasão e na infecção de mucosas, pois se liga à mucina gástrica presente no epitélio estomacal (CORTEZ et al., 2014); gp35/50 – é uma glicoproteína de superfície associada com eventos de sinalização que favorecem o recrutamento de actina no processo de invasão celular, mobilização de cálcio intracelular e também estão presentes em epimastigotas (YOSHIDA; CORTEZ, 2008); Tc-85 - é uma glicoproteína de superfície relacionada com a invasão celular (NDE et al., 2012); gp90 – é uma glicoproteína de superfície que modula negativamente a infectividade do parasita, ou seja, diminui a invasão celular ao contrário das já citadas até o momento (RODRIGUES et al., 2017).

Tripomastigotas obtidos de cultura de células (TCTs) apresentam outros tipos de moléculas como: gp85 – é uma glicoproteína de superfície com capacidade de reconhecer fibronectina, citoqueratina e laminina (são componentes da matriz extracelular) e facilitar o processo de invasão (CAMPO et al., 2016); cruzipaina (gp57/51) – é uma cisteína protease secretada envolvida na invasão e desenvolvimento celular, importante para a sobrevivência do parasita, além disso é presente em todas as formas evolutivas de *T. cruzi* (SAN FRANCISCO et al., 2017); oligopeptidase B – é uma serina protease secretada envolvida diretamente na capacidade infectiva de *T. cruzi* e presente em todas as formas evolutivas (MOTTA et al., 2019); SAP (proteínas ricas em serina, alanina e prolina) - são proteínas secretadas que aderem na superfície celulares, induzindo a entrada de cálcio e promovendo a invasão celular (BAIDA et al., 2006).

P21 (proteína 21 de *T. cruzi*) é uma proteína secretada por *T. cruzi* e possui um importante papel durante o processo de invasão, todas as suas formas evolutivas expressam essa proteína. Ela é responsável por aumentar a fagocitose das células hospedeiras (mais especificamente, macrófagos), pois estimula o rearranjo do citoesqueleto de actina e consequente internalização do parasita (RODRIGUES et al., 2012). Essa proteína também aumenta a produção de sFlt-1 pelos macrófagos e inibe a proliferação de células endoteliais, promovendo uma ação anti-angiogênica (TEIXEIRA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017). Além disso, p21 também estimula a quimiotaxia de células imunológicas (TEIXEIRA et al., 2015).

Em relação aos receptores celulares nas quais se ligam essas glicoproteínas de superfície e/ou secretadas por *T. cruzi*, acredita-se que qualquer molécula exposta na superfície da célula hospedeira pode ser um potencial ligante. Em geral, os receptores possuem carboidratos com resíduos de galactosil, manosil e sialil, além de proteínas semelhantes a lectinas que se ligam a resíduos de carboidratos presentes na superfície do parasita (CARVALHO; BARRIAS, 2017). Um exemplo é a proteína galectina-3 que controla a carga parasitária e limita o dano tecidual durante a doença de Chagas (SILVA et al., 2017) e o receptor CXCR4 (receptor pra quimiocinas CXC4) que ativa o processo pró-infectivo de *T. cruzi* a partir da sua ligação com P21 (RODRIGUES et al., 2012). Outros possíveis receptores são a endotelina 1 e receptores de bradicinina, utilizados por tripomastigotas para invadir células cardíacas levando a um quadro clínico de CCC (SCHARFSTEIN, 2018). A citoqueratina, fibronectina, laminina e integrinas também são moléculas que atuam como receptoras, pois permitem a ligação de Tc-85 (MAGDESIAN et al., 2001). Algumas glicoproteínas ainda possuem receptores não identificados nas células hospedeiras.

#### **1.1.6. Sistema Imune**

A imunidade inata é ativada frente a infecção por *T. cruzi* através de vias do complemento a partir da entrada do parasita na corrente sanguínea (tripomastigotas). A via lectínica é ativada com a ligação de colectinas e ficolinas a moléculas glicosiladas e acetiladas presentes na superfície dos tripomastigotas sanguíneos, enquanto a via alternativa é ativada a partir da hidrólise de C3 (LUZ et al., 2016; DE BONA et al., 2018). O parasita possui alguns mecanismos de evasão da resposta imune, como moléculas de superfície gp160 e gp58/068, elas atrapalham a ligação inicial das moléculas do complemento e inibem a formação de C3 convertase, permitindo que escapem da lise mediada pelo complemento (RAMIREZ-TOLOZA; FERREIRA, 2017; DE BONA et al., 2018).

Além do complemento, outra parte do sistema imune inato envolvida inicialmente na infecção de *T. cruzi* é a celular. Os macrófagos são um dos primeiros leucócitos recrutados e secretam interleucina 12 (IL-12), ativando células *natural killer* (NK) que por sua vez produzem interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), recrutando e potencializando a atividade efetora de macrófagos que envolve principalmente a produção de óxido nítrico (NO) e consequente morte do parasito (GUERRERO et al., 2015; FRESNO; GIRONES, 2018). Além disso, o IFN- $\gamma$  promove 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 (ÁLVAREZ et al., 2014). A imunidade inata desenvolvida frente a infecção por *T. cruzi* é importante para prevenir proliferação intracelular exacerbada, mas na maioria das vezes, somente ela não é suficiente, mas é essencial para o início da resposta imune adaptativa.

*T. cruzi* é capaz de desencadear resposta tanto de células T *helper* 1 (Th1) quanto células T *helper* 2 (Th2) e a proteção está relacionada ao equilíbrio entre elas, desempenhando um papel no controle do nível parasitário e fornecendo proteção contra o excesso de dano tecidual (SANOJA et al., 2013). Esse balanço é dado em relação a produção de citocinas por linfócitos T durante a fase aguda (FRESNO; GIRONES, 2018). Perifericamente e no miocárdio, a resposta Th1 é predominante e caracterizada pela expressão do fator de transcrição Tbet e citocinas (IFN- $\gamma$ , IL2, IL-12, e TNF- $\alpha$ ), suprimindo 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).

Em um estudo de infecção aguda, houve uma alta expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ ), enquanto ao mesmo tempo citocinas anti-inflamatórias como (IL-10) foram altamente produzidas. *T. cruzi* estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias como um mecanismo de evasão da resposta imune possibilitando a permanência da infecção e conseqüentemente favorecendo o processo de cronificação (MARTINS et al., 2020). Pacientes com a forma indeterminada da doença, apresentam um perfil de citocinas anti-inflamatórias, enquanto pacientes com cardiomiopatia chagásica, apresentam um perfil excessivamente pró-inflamatório (CHAVES et al., 2016).

Ainda em relação a resposta imune adaptativa, 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).

Por fim, a incompleta eliminação do parasita pelo sistema imune pode resultar em dano tecidual, uma vez que leva a exposição de novos epítomos e produção de autoanticorpos, podendo desenvolver um quadro de autoimunidade durante a doença de Chagas (DE BONA et al., 2018).

### **1.1.7. Mecanismos de invasão celular**

Após a adesão do parasita na membrana plasmática da célula ocorrem diversos processos de sinalização intracelular que resultam na internalização de *T. cruzi*. São utilizados 3 diferentes mecanismos para esse fim: dependente de exocitose de lisossomos, dependente de endocitose e dependente de actina (MORETTI et al., 2020).

O mecanismo dependente de exocitose inicia a partir de um dano físico que o parasita é capaz de realizar na membrana plasmática da célula hospedeira, esse dano permite um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o meio intracelular e leva a exocitose de lisossomos. A exocitose ocorre por haver um receptor de cálcio (sinaptotagmina) na membrana lisossomal que o encaminha para a região do dano da membrana plasmática com a intenção de rapara-lo, pois possui em seu interior uma enzima chamada de esfingomielinase ácida (ASM) (IRETON et al., 2018). A ASM converte, na região danificada, esfingomielina (fosfolípido de membrana) em ceramida e por diferença estrutural, facilita a brotação interna e endocitose da membrana danificada. Desse modo, *T. cruzi* utiliza da formação desse endossomo para entrar na célula hospedeira (ANDREWS, 2019). Essa via pode ser ativada não apenas pelo dano físico causado pelo parasitas, mas também pela ligação de moléculas do parasita com receptores da célula hospedeira que levarão ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , são exemplos: gp82 se ligando ao receptor de lisossomos LAMP-2 (presente na membrana plasmática), oligopeptidase B se ligando ao receptor de proteína G acoplada e cruzipaina se ligando ao receptor de bradicinina (HORTA et al., 2020).

O mecanismo dependente de endocitose envolve a ligação de moléculas de superfície de *T. cruzi* com *Toll like receptor 2* (TLR2), essa ligação estimula a fagocitose a partir da ativação de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) classe I, que fosforila a fosfatidilinositol (4,5) - bifosfato (PIP2), originando a PIP3, a qual se acumula na membrana plasmática, levando a formação de um fagossomo envolvendo o parasita provocando assim a internalização, posteriormente há a formação do fagolisossomo (MAEDA et al., 2012).

O mecanismo dependente de actina envolve o remodelamento do citoesqueleto de actina ao redor de *T. cruzi*. Essa polimerização se inicia a partir da ligação de moléculas secretadas pelo parasita com receptores na célula hospedeira, estimulando a formação de pseudópodes na membrana plasmática, internalização em um endossomo e posterior fusão com lisossomos (VIEIRA et al., 2002). Um exemplo seria o que acontece com a secreção da proteína 21 de *T. cruzi* e sua posterior ligação com CXCR4 da célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012). Esse mecanismo lembra o processo de fagocitose, porém não pode ser chamado dessa forma já que acontece com células fagocíticas e não-fagocíticas, além de não haver a participação de PIP3.

A fusão dos lisossomos com os endossomos formados a partir da entrada de *T. cruzi* na célula é mediado pelo remodelamento do esqueleto de actina da célula, permitindo a fusão lisossomal e conseqüente sucesso no processo de invasão celular. Entretanto, quando parasitas internalizados não se fundem com lisossomos e/ou não induzem o remodelamento da actina

celular, o processo de invasão se torna reversível e *T. cruzi* deixa a célula recém invadida (WOOLSEY; BURLEIGH, 2004; CARDONNA; BURLEIGH, 2011).

A forma tripomastigota é considerada a forma infectante, portanto de forma geral, ela é responsável pelos 3 diferentes mecanismos de invasão de *T. cruzi*. Entretanto, é importante mencionar que amastigotas liberados extracelularmente, também são capazes de invadir células hospedeiras pelo mecanismo dependente de actina (FERNANDES et al., 2013).

*T. cruzi* utiliza de diferentes mecanismos para entrar nas suas células hospedeira. E independente da via utilizada, o parasita vai ser localizar em um endossomo, logo após se fundir com lisossomos da célula hospedeira e formar o fagolisossomo (vacúolo parasitóforo). O tripomastigota secretará uma proteína chamada Tc-Tox que formará pequenos poros para destruir a membrana do vacúolo parasitóforo. No citoplasma se transformará em amastigota, passará pelo processo de replicação, se transformará em tripomastigota novamente, romperá a célula e será liberado no meio extracelular (STECCONI-SILVA; MORTARA, 2003).

#### **1.1.8. Tratamento da Doença de Chagas**

Pelos últimos 50 anos, as drogas de escolha foram benzonidazol e nifurtimox para o tratamento da infecção por *T. cruzi* (MARTINEZ et al., 2020). Porém, eles possuem algumas características que não os tornam um medicamento ideal, primeiramente possuem um período longo de tratamento (60 e 90 dias, respectivamente) e uma taxa de cura em torno de 70%, além de possuírem alta toxicidade hepática e renal e serem contraindicados para gestantes (WHO, 2015). Reações adversas como dermatite alérgica, neuropatia periférica, anorexia, perda de peso e insônia são um dos principais motivos pela qual muitos pacientes abandonam o tratamento (VIOTTI et al., 2009).

Benzonidazol e nifurtimox funcionam como pró-drogas, ou seja, são metabolizadas e seus metabólitos possuem atividade tripanocida a partir da mutagênese nos mecanismos de reparo de DNA e instabilidade cromossômica do parasita (FRANCISCO et al., 2020). Os medicamentos tem como alvo parasitas circulantes no sangue, portanto, de forma geral apenas pacientes em fase aguda são potencialmente tratáveis com essas drogas e mesmo que não sejam curados podem prevenir uma piora nos quadros clínicos da doença de Chagas, incluindo falhas cardíacas. Porém a maioria dos pacientes nessa fase são assintomáticos, tornando o número de tratáveis ainda menor, muitos vão descobrir a presença dessa patologia apenas após sua cronificação, nessa fase os medicamentos não tem o mesmo efeito (PINAZO et al., 2013).

A pesquisa de novos tratamentos envolve a busca de novos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para substituir o benzonidazol, e a busca de agentes adjuvantes que possam aumentar a eficácia ou reduzir as doses dos medicamentos. As principais abordagens envolvem a inibição de etapas do ciclo parasitário: biossíntese de ergosterol (por exemplo, posaconazol e outros azóis antifúngicos - afetam a produção da membrana plasmática do parasita), metabolismo da tripanotona (amiodarona e dronedarona), metabolismo do pirofosfato (bifosfonatos), cruzipaina (K777 e derivados), metabolismo do cálcio (amiodarona, dronedarona), síntese de proteínas e purinas, e compostos que prejudicam o metabolismo redox (compostos nitroaromáticos como benzonidazol, nifurtimox e fexinidazol) (SALES JUNIOR et al., 2017). Apesar de muitas pesquisas serem realizadas em relação a busca por tratamentos para doença de Chagas tanto em fase aguda quanto crônica, nenhum tratamento é superior ao benzonidazol e nifurtimox para a infecção por *T. cruzi* (MARTINEZ et al., 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas afeta 8-10 milhões de pessoas no mundo, de modo geral são maiores de 50 anos e com histórico de moradia em áreas rurais. Normalmente, são percebidos sintomas na fase crônica da doença que envolvem principalmente um quadro clínico de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), durante a fase aguda a maioria dos pacientes são assintomáticos, porém os que detectam ainda nessa fase conseguem se tratar com benzonidazol ou nifurtimox, as drogas utilizadas atualmente. Entretanto, apesar de serem efetivas em 70% dos casos, as reações adversas desses medicamentos fazem com que grande parte abandone o tratamento antes do fim e mesmo que em alguns casos não haja cura, melhora o prognóstico de progressão da doença.

Hoje existem vários grupos de estudos buscando por novos medicamentos que sejam menos tóxicos e mais eficazes que as duas drogas utilizadas atualmente. E para alcançar esse objetivo, são necessários diversos estudos que compreendam a biologia molecular de *T. cruzi* e das células por ele parasitadas. Uma das etapas que pode funcionar como alvo terapêutico é o processo de invasão celular do parasito, de maneira que se algum passo desse processo for interrompido, evita a progressão da doença.

Em nosso trabalho buscamos atuar em uma proteína estrutural importante para *T. cruzi* e células de mamífero, a miosina-1 e um receptor que ainda não havia sido identificado seu papel para o processo de infecção por esse tripanosomatídeo, Dectina-1. Ambos atuam em diferentes etapas do processo de invasão celular, portanto estudar seus papéis e importância podem torna-los alvos terapêuticos em potencial.

O papel da miosina-1 tanto de *T. cruzi* quanto da célula hospedeira foi investigado como um possível bloqueador da progressão da doença de Chagas. Ainda não existem estudos que envolvam o papel dessa proteína na biologia molecular de *T. cruzi* e nem seu envolvimento com a biologia celular da doença de Chagas.

O receptor da imunidade inata Dectina-1 vem sendo bastante estudado em diversas patologias, desde infecções fúngicas até *Leishmania* e o papel desse receptor tem se mostrado dubio. Para alguns protozoários ele auxilia no processo de infecção em outros ele limita, mesmo que sejam do mesmo grupo taxonômico. Ainda não existem estudos do papel desse receptor envolvido na progressão da infecção por *T. cruzi*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Investigar as propriedades biológicas da proteína Miosina-1 e do receptor Dectina-1 durante o processo de invasão celular de *T. cruzi*.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a motilidade, capacidade de aderência em mioblastos murinos e capacidade de multiplicação de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* após a inibição de miosina-1;
- Avaliar o envolvimento de rP21 no processo de invasão de *T. cruzi* com miosina-1 inibida;
- Avaliar o processo de invasão celular após a inibição de miosina-1 de *T. cruzi*, de mioblastos murinos e dos dois ao mesmo tempo;
- Avaliar o tráfego intracelular de lisossomos na infecção por *T. cruzi* após o bloqueio da miosina-1;
- Avaliar o papel de CHMP4B durante o processo de invasão celular de *T. cruzi* e seu envolvimento com a miosina-1;
- Avaliar o processo de invasão celular e multiplicação de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em células WT e Dectina-1<sup>-/-</sup>;
- Avaliar o papel de rP21 durante o processo de infecção por *T. cruzi* em células WT e Dectina-1<sup>-/-</sup>;
- Avaliar a expressão de CXCR4 em células WT e Dectina-1<sup>-/-</sup>.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de estudo

Os ensaios deste estudo foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI) e Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia. Além destes, realizamos as imagens de imunofluorescência em microscópio confocal na Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM), pertencente a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Uberlândia (PROPP).

### 4.2. Cultura de células

Foram utilizadas células Vero para manutenção do ciclo de *T. cruzi in vitro* e mioblastos murinos imortalizados (C2C12). Ambas as células foram obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para cultivo das mesmas, utilizou-se 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 CO<sub>2</sub>.

### 4.3. Cultura de parasitos

Formas tripomastigotas de cultura de tecido da cepa Y de *T. cruzi* (TCTY) foram mantidas em células Vero com meio DMEM suplementado com 2,5% de SFB, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os parasitas foram periodicamente inoculados em camundongos C57BL/6 para manter a infectividade.

### 4.4. Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas *wild type* (WT) e *Dectina-1<sup>-/-</sup>*, 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 003/18 (Anexo I).

#### **4.5. Obtenção de macrófagos peritoneais**

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

#### **4.6. Síntese de Pentacloropseudilina (PCLP)**

PCLP foi sintetizado, como previamente descrito, por Martin et al. (2009) e gentilmente cedido para realização deste trabalho.

#### **4.7. Purificação da rP21**

Para produção da proteína P21 recombinante foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 transfectadas com o plasmídeo pET-28<sup>a</sup>(+) (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 (DO) 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  $\mu$ L 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 20.000 x 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, TrisHCl 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 enovelamento proteico. A solução de PBS 1x foi repostada 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).

#### **4.8. Viabilidade celular de *T. cruzi* e C2C12**

Este ensaio foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, a partir da solução estoque de 2.000 $\mu$ M de PCLP, sendo feitas as diluições em DMEM e obtendo as concentrações a serem testadas (50  $\mu$ M à 0,78125 $\mu$ M).

Para *T. cruzi*, o volume final de cada poço foi de 100  $\mu$ L, sendo 20  $\mu$ L de inóculo (solução com  $1 \times 10^8$  parasitas/poço) e 80  $\mu$ L de PCLP (nas referidas concentrações). Foram realizados os controles de crescimento dos parasitas (positivo) e de morte (negativo) com DMSO 10%.

Para C2C12, a microplaca foi plaqueada contendo  $1 \times 10^4$  células/poço com 100  $\mu$ L de DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e substituído por DMEM contendo as diferentes concentrações de PCLP a serem testadas. Também foram realizados os controles de crescimento das células (positivo) e de morte (negativo) com DMSO 10%.

As placas de *T. cruzi* e de C2C12 foram incubadas por 4 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi adicionado 3  $\mu$ L e 6  $\mu$ L, respectivamente, em cada poço de uma solução de resazurina a 3 mM em solução salina (PBS) (ROLÓN et al., 2006) e novamente incubado nas mesmas condições por 18 horas. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595nm em um espectrofotômetro de microplaca (Molecular Devices Spectramax).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos valores das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função das seguintes fórmulas:

$$\text{Toxicidade} = \frac{100 \times (\text{média amostra} - \text{média do controle positivo})}{\text{Média do controle positivo}}$$

$$\text{Viabilidade} = 100 - (\text{toxicidade})$$

#### 4.9. Ensaio de motilidade

Para o ensaio de motilidade foi realizado o tratamento prévio de  $1,5 \times 10^6$  TCTY com PCLP na concentração 5 $\mu$ M em 1,5mL, em tubos tipo falcon (15mL) de fundo cônico, por 2 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Também foi realizado o controle sem nenhum tratamento (apenas DMEM 2,5% SBF). Em seguida, os dois grupos de parasitas: tratados com PCLP e não tratados, foram centrifugados e ressuspensos em 100 $\mu$ L de DMEM, 20 $\mu$ L foram pipetados em placas de petri para confocal com lamínula no fundo (SPL LifeSciences) e as imagens que construíram o vídeo foram obtidas através de 50 cortes ópticos seriados com intervalo de 0,1 segundos cada, na objetiva de 63x em microscópio confocal (LSM 510 META ZEISS). Após a obtenção do vídeo foi avaliada qualitativamente a motilidade de TCTY tratados ou não com PCLP e a análise quantitativa da distância percorrida foi calculada no programa Image J e ajustada para a escala da imagem obtida.

#### 4.10. Ensaio de aderência na superfície celular

Em placas de 24 poços, foram adicionadas lamínulas de 13mm ao fundo e C2C12 foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos e depois lavadas com solução salina (PBS). Os parasitas foram previamente incubados (ou não) com 5µM de PCLP na proporção de 10 parasitas/célula por 1 hora e em seguida colocados em contato com as células fixadas para que fosse avaliada a capacidade de adesão na superfície celular em 2 horas. Após esse período, as células seguiram para marcação por Giemsa ou Imunofluorescência.

Na marcação por Giemsa, a lamínula foi fixada com solução de Bouin por 15 minutos, o corante Giemsa foi adicionado na diluição 1/20 por 35 minutos, e as lâminas foram montadas. Em seguida, a contagem de 200 células totais (com parasitas aderidos ou não) foi realizada em microscópio óptico, dentre as quais, o número de células que tinham parasitos aderidos na sua superfície e o número total de parasitas foram contados nos dois grupos (tratados ou não com PCLP).

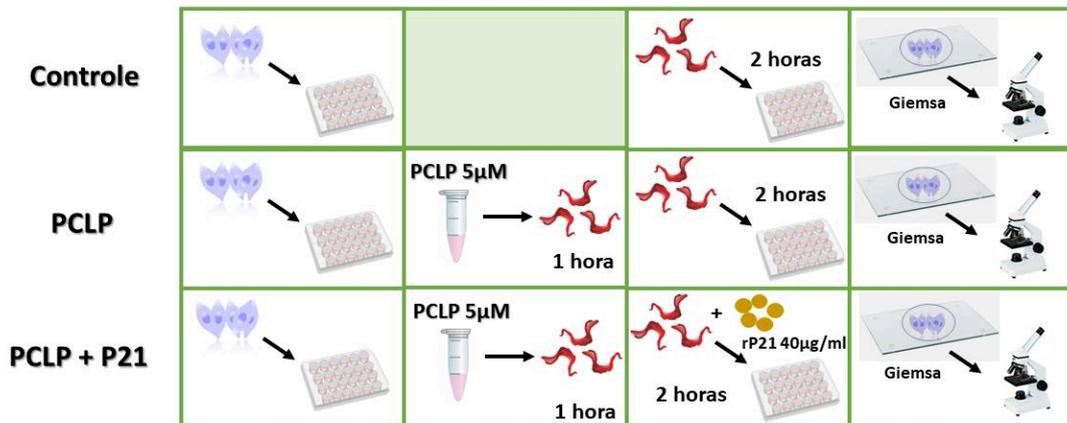
Na marcação por imunofluorescência (RIFI), a lamínula foi fixada novamente em formaldeído 4% por 30 minutos. Após esse passo, o anticorpo primário de humano anti-*T. cruzi* (1/50) foi acrescentado a lamínula e incubado por um período de 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida foram adicionados o anticorpo secundário anti-humano-FITC (1/200), faloidina-TRITC (1/50) e TO-PRO3 (1/500) por 1 hora, marcando o parasita, o citoesqueleto de actina e o núcleo, respectivamente. As lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% de parafenilenodiamina (PPD – anti-*phaging*). As imagens foram adquiridas no aumento de 40x em microscópio confocal (LSM 510 META ZEISS). Em seguida, as imagens foram analisadas com a contagem de 50 células totais (com parasitas aderidos ou não), dentre as quais, o número de células que tinham parasitos aderidos na sua superfície e o número total de parasitas foram contados nos dois grupos (tratados ou não com PCLP).

#### 4.11. Ensaio de invasão

Em placas de 24 poços, foram adicionadas lamínulas de 13mm ao fundo e C2C12 foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Os parasitas foram colocados em contato com as células para invadi-las por 2 horas, na proporção

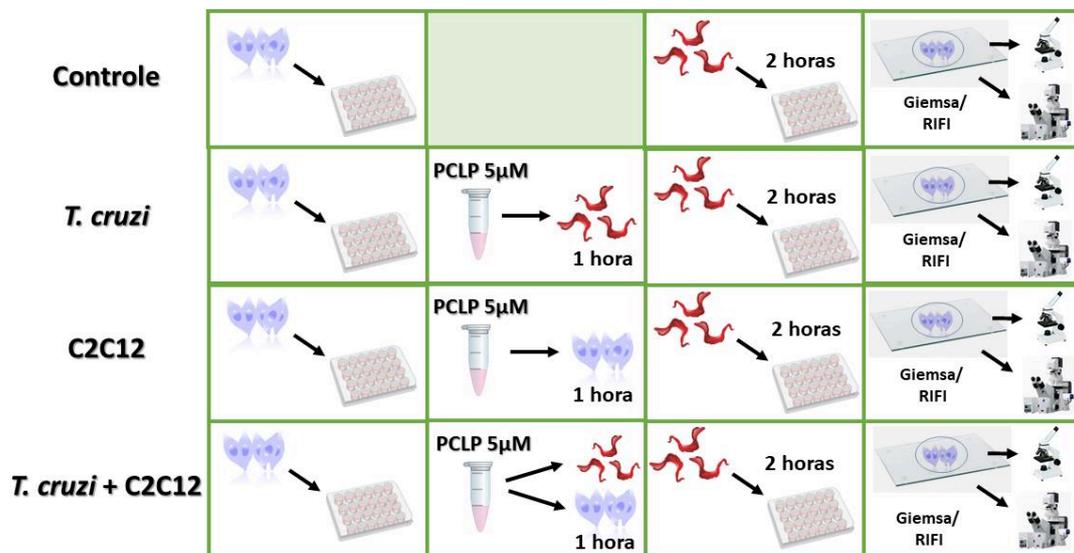
de 10 parasitas/célula. Seguiram diferentes protocolo de tratamento para os seguintes grupos avaliados:

No primeiro ensaio foi avaliado o papel de rP21 frente a inibição da miosina de C2C12. Grupo controle: células foram plaqueadas e parasitas (10:1) colocados para invadir, sem nenhum tipo de tratamento; grupo PCLP: células foram plaqueadas e parasitas previamente tratados com 5 $\mu$ M de PCLP (10:1) colocados para invadir; grupo PCLP + P21: células plaqueadas e parasitas previamente tratados com 5 $\mu$ M de PCLP (10:1) colocados para invadir em meio de cultura contendo 40 $\mu$ g/ml de rP21. Após o ensaio, foi realizada a marcação por Giemsa, a lamínula foi fixada com solução de Bouin por 15 minutos, o corante Giemsa foi adicionado na diluição 1/20 por 35 minutos, e as lâminas foram montadas. Em seguida, foi realizada a contagem de 300 células em microscópio óptico, dentre as quais, o número de células infectadas e o número total de parasitas foram contados nos três grupos.



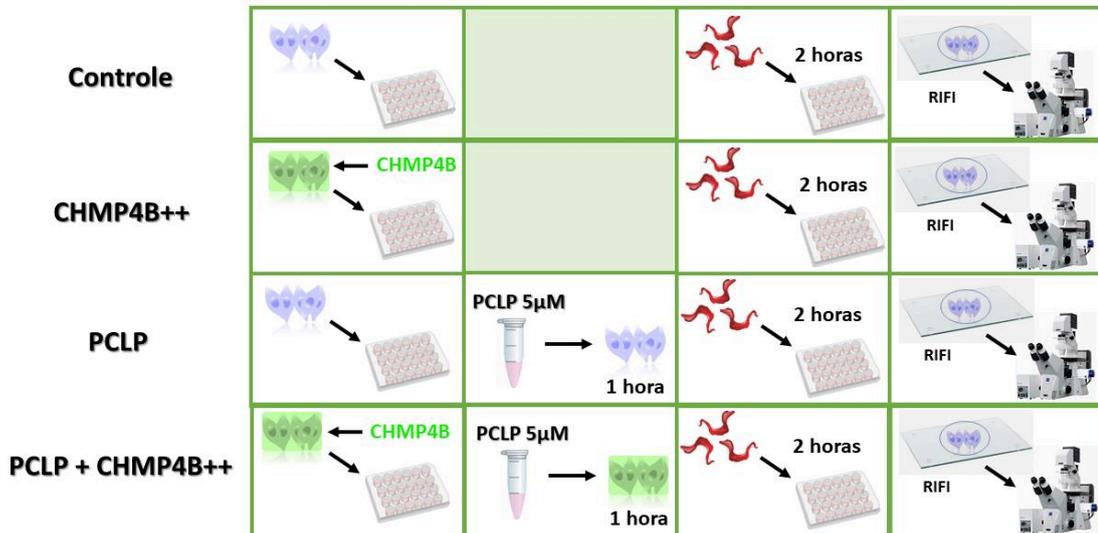
No segundo ensaio, foi avaliado o duplo tratamento com PCLP, ou seja, além da inibição de miosina de *T. cruzi* e C2C12 isolados, também foi feito o tratamento dos dois ao mesmo tempo para avaliar se haveria um efeito cumulativo. Grupo *T. cruzi*: células foram plaqueadas e parasitas previamente tratados com 5 $\mu$ M de PCLP (10:1) colocados para invadir; grupo C2C12: células foram plaqueadas e tratadas com 5 $\mu$ M de PCLP, os parasitas foram colocados para invadir (10:1) sem tratamento algum; grupo *T. cruzi* + C212: células foram plaqueadas e tratadas com 5 $\mu$ M de PCLP, além disso os parasitas também foram tratados com 5 $\mu$ M de PCLP e colocados para invadir as células. Após o ensaio, foi realizada a marcação por Giemsa, a lamínula foi fixada com solução de Bouin por 15 minutos, o corante Giemsa foi adicionado na diluição 1/20 por 35 minutos, e as lâminas foram montadas. Em seguida, foi realizada a contagem de 300 células em microscópio óptico, dentre as quais, o número de células infectadas e número total de parasitas foram contados nos quatro grupos, por fim foi realizada a proporção da quantidade de parasitas nas células infectadas. Além do Giemsa, foi realizado o ensaio de

imunofluorescência, a lamínula foi fixada em formaldeído 4% por 30 minutos. Após esse passo, o anticorpo primário de humano anti-*T. cruzi* (1/50) foi acrescentado a lamínula e incubado por um período de 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida foram adicionados o anticorpo secundário anti-humano-FITC (1/200) e faloidina-TRITC (1/50) por 1 hora, marcando o parasita e o citoesqueleto de actina, respectivamente. As lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% de paraifenilendiamina (PPD – anti-fading). As imagens foram adquiridas no aumento de 40x em microscópio confocal (LSM 510 META ZEISS).

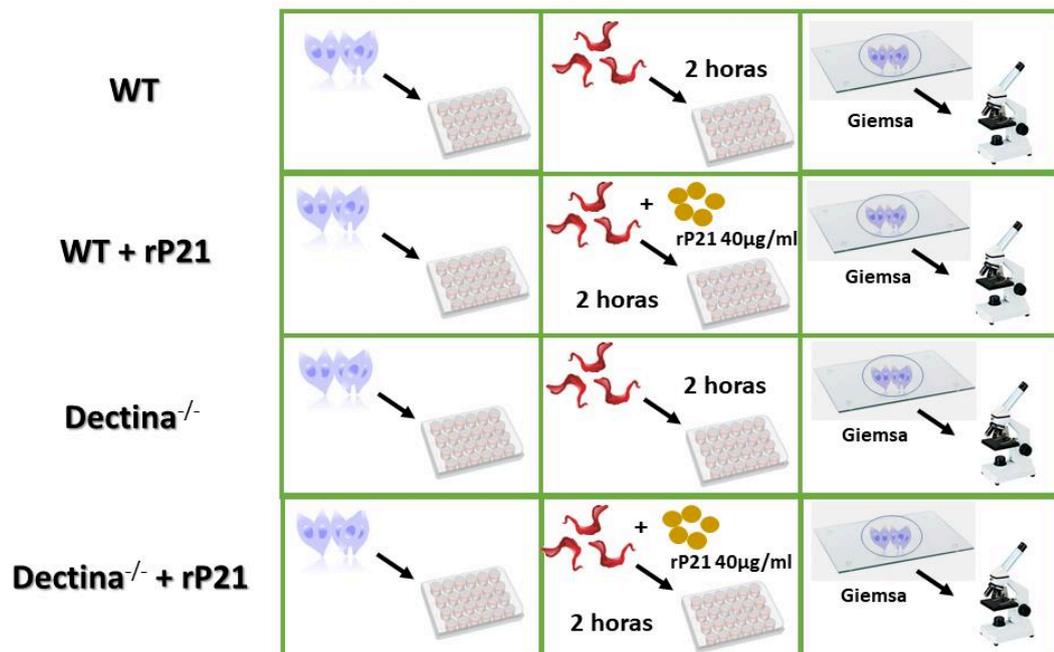


No terceiro ensaio, foi avaliado o processo de invasão de células superexpressando a molécula CHMP4B, além disso foi avaliado também se a inibição da miosina interferiria em seu processo invasão. Grupo controle: células foram plaqueadas e parasitas sem nenhum tipo de tratamento colocados para invadir (10:1); grupo CHMP4B++: células superexpressando a molécula CHMP4B foram plaqueadas e parasitas colocados para invadir, sem nenhum tratamento (10:1); grupo PCLP: células foram plaqueadas e tratadas com 5µM de PCLP, os parasitas foram colocados para invadir (10:1) sem tratamento algum; grupo PCLP + CHMP4B++: células superexpressando a molécula CHMP4B foram plaqueadas e tratadas com 5µM de PCLP, os parasitas foram colocados para invadir (10:1) sem tratamento algum. Após o ensaio, a lamínula foi fixada novamente em formaldeído 4% por 30 minutos e o anticorpo primário de humano anti-*T. cruzi* (1/50) foi acrescentado a lamínula e incubado por um período de 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida foram adicionados o anticorpo secundário anti-humano-TRITC (1/200) e TO-PRO3 (1/500) por 1 hora, marcando o parasita, e o núcleo, respectivamente. Lembrando que a superexpressão de CHMP4B traz a marcação da molécula com GFP. As lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1%

de parafenilendiamina (PPD – anti-*phaging*). As imagens foram adquiridas no aumento de 40x em microscópio confocal (LSM 510 META ZEISS). Em seguida, as imagens foram analisadas com a contagem em 50 células totais, do número de células que tinham parasitos internalizados.



No quarto ensaio de invasão, foi avaliado qual o comportamento do receptor de Dectina-1, com e sem o tratamento com a rP21. Grupo WT: macrófagos peritoneais de camundongos WT foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1); grupo WT + p21: macrófagos peritoneais de camundongos WT foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) em meio de cultura contendo 40µg/ml de rP21; grupo Dectina-1<sup>-/-</sup>: macrófagos peritoneais de camundongos Dectina-1<sup>-/-</sup> foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1); grupo Dectina-1<sup>-/-</sup> + rP21: macrófagos peritoneais de camundongos Dectina-1<sup>-/-</sup> foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) em meio de cultura contendo 40µg/ml de rP21. Após o ensaio, foi realizada a marcação por Giemsa, a lamínula foi fixada com solução de Bouin por 15 minutos, o corante Giemsa foi adicionado na diluição 1/20 por 35 minutos, e as lâminas foram montadas. Em seguida, foi realizada a contagem de 300 células em microscópio óptico e o número total de parasitas foram contados nos quatro grupos.



#### 4.12. Ensaio de multiplicação

Em placas de 24 poços, foram adicionadas lamínulas de 13mm ao fundo e C2C12 foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ , permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Os parasitas foram previamente incubados (ou não) com  $5\mu\text{M}$  de PCLP na proporção de 5 parasitas/célula por 1 hora e em seguida colocados em contato com as células para invadi-las por 2 horas. Posteriormente, o meio foi retirado juntamente com parasitas que não foram internalizados. As lamínulas foram retiradas após os períodos de 24, 48 e 72 horas após a invasão, fixadas com solução de Bouin por 15 minutos, o corante Giemsa foi adicionado na diluição 1/20 por 35 minutos, e as lâminas foram montadas. Para a contagem dessas lâminas a avaliação foi feita em 300 células infectadas, o número de amastigotas intracelulares que haviam.

Em placas de 24 poços, foram adicionadas lamínulas de 13mm ao fundo e macrófagos peritoneais WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> plaqueados  $5 \times 10^4$  células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ , permitindo que as células aderissem ao fundo do poço, sendo avaliados dois tipos celulares de macrófagos: WT e Dectina-1<sup>-/-</sup>. Os parasitas foram colocados em contato com as células para invadi-las por 2 horas, na proporção de 5 parasitas/célula. Posteriormente, o meio foi retirado juntamente com parasitas que não foram internalizados. As lamínulas foram retiradas após os períodos de 24, 48 e 72 horas após

a invasão, fixadas com solução de Bouin por 15 minutos, o corante Giemsa foi adicionado na diluição 1/20 por 35 minutos, e as lâminas foram montadas. Para a contagem dessas lâminas a avaliação foi feita em 300 células infectadas, o número de amastigotas intracelulares que haviam.

#### **4.13. Cinética de lisossomos**

Em placas de 24 poços, foram adicionadas lamínulas de 13mm ao fundo e C2C12 foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Em seguida, as células foram tratadas ou não por 1 hora com 5µM de PCLP antes de colocar os parasitas para invadir (proporção:10 parasitas/célula) pelos períodos de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos. Depois, o anticorpo primário de humano anti-*T. cruzi* (1/50) e de rato anti-LAMP1 (1/50) foi acrescentado a lamínula e incubado por um período de 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida foram adicionados o anticorpo secundário anti-humano-FITC (1/200) e anti-rat-ALEXA FLUOR 594 (1/50) por 1 hora, marcando o parasita e os lisossomos respectivamente. As lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% de parafenilendiamina (PPD – anti-*phaging*). As imagens para análise qualitativa foram adquiridas no aumento de 63x em microscópio confocal (LSM 510 META ZEISS). Após a obtenção das imagens em diferentes tempos, foi avaliado quantitativamente a área de lisossomos recrutados em células tratadas ou não com PCLP pelo programa Image J.

#### **4.14. Superexpressão de CHMP4B**

O DNA plasmideal pEGFP-C1-CHMP4B foi gentilmente cedido pelo Prof. Hideki Shibata do Laboratório de Regulação Celular e Molecular da Universidade de Nagoya, Japão.

Para a transfecção transiente de células C2C12 foi utilizado o reagente Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (TermoFisher Scientific). Brevemente, em placas de 24 poços, foram adicionadas lamínulas de 13mm ao fundo e C2C12 foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Em seguida foi adicionado o reagente Lipofectamina (kit) + P3000 (kit) + DNA plasmidial + meio sem antibiótico, foram

incubados por 12,5 minutos e após esse período inseridos nos poços. Após 48 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, as células estavam prontas para os ensaios.

#### 4.15. Expressão de CXCR4

A expressão do receptor CXCR4 foi analisada em macrófagos peritoneais de camundongos WT e Dectina-1<sup>-/-</sup>, sem nenhum tipo de estímulo e/ou tratamento, se naturalmente havia diferença nessas expressões.

No ensaio de citometria, as células foram colocadas em tubos de citometria de fluxo na quantidade de 2x10<sup>5</sup> células por tubo, fixadas e incubadas com o anticorpo Anti-CD184 (CXCR4) conjugado com PE (1/30) por 1 hora. Finalizado esse tempo, as amostras foram centrifugadas, ressuspendidas em PBS e então 12.000 eventos foram adquiridos no citômetro Cytotflex (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA). As análises foram feitas no software Kaluza (Beckman Coulter's, Brea, Califórnia, EUA).

No ensaio de imunofluorescência, macrófagos peritoneais WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm, na quantidade de 5x10<sup>4</sup> células/poço em DMEM 10% SFB, incubada por 18 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Após esse tempo, as células foram fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos e depois em contato com o anti-CXCR4 conjugado com PE (1/30) e TO-PRO-3 (1:500) por 1 hora, marcando o CXCR4 e o núcleo, respectivamente. As lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% de parafenilendiamina (PPD – anti-*phaging*). As imagens para análise qualitativa foram adquiridas no aumento de 63x em microscópio confocal (LSM 510 META ZEISS).

# CAPÍTULO 1

A INIBIÇÃO DE MIOSINA DE CLASSE 1 EM *T. CRUZI* E MIOBLASTOS MURINOS  
PREJUDICA A INVASÃO CELULAR *IN VITRO*

## 5. INTRODUÇÃO

### 5.1. Miosina

#### 5.1.1. Células humanas

As proteínas motoras são proteínas que utilizam a hidrólise de ATP para se moverem ao longo de filamentos do citoesqueleto de actina (URAY et al., 2020). Algumas são responsáveis pelo transporte de organelas e vesículas no meio intracelular, outras fazem com que os filamentos deslizem um sobre os outros com a intenção de criar uma contração muscular, batimento de cílios ou flagelos, além de participarem também da citocinese (divisão celular) (SCHLIWA; WOEHLKE, 2003). Existem 3 grupos de proteínas motoras: cinesinas e dineínas que trafegam nos microtúbulos e a miosina que trafega na actina. Humanos apresentam oito isoformas de miosinas (Miosina 1A até Miosina 1H) (GREENBERG; OSTAP, 2013)

Miosinas possuem diversas funções como: fagocitose, citocinese, transdução de sinal e tráfego de organelas e partículas, e o no músculo esquelético está diretamente relacionada com a contração muscular (KITTELBERGER et al., 2016). De acordo com suas funcionalidades elas foram divididas em miosinas não-musculares (miosina do tipo 1) e miosinas musculares (miosina do tipo 2).

As miosinas do tipo 1 (ou classe 1), não-musculares, possuem um sítio de ligação com a actina e outro sítio com as membranas e, portanto, estão envolvidas com organização e transporte intracelular, além de interagir com microtúbulos e reorganização de cromatina. Entretanto, há outras funcionalidades ainda desconhecidas para essas proteínas (WOOLNER; BEMENT, 2009). As miosinas do tipo 2 (ou classe 2), musculares, são consideradas convencionais e realizam a atividade de contração muscular e citocinese celular (ÁLVAREZ-SANTOS et al., 2020).

#### 5.1.2. *T. cruzi*

Apenas 3 microrganismos foram identificados como não possuindo nenhum tipo de miosina em sua estrutura celular: a alga vermelha unicelular *Cyanidioschyzon merolae* e os parasitas *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. A miosina de maior distribuição taxonômica é a do tipo 1, porém Apicomplexas e Viridiplantae não possuem esse tipo de proteína em sua constituição celular. Com a evolução muitos organismos perderam alguns tipos

de miosinas em sua constituição, mas ao mesmo tempo surgiram miosinas exclusivas de determinados organismos, chamadas de miosinas órfãs, inclusive *Tetrahymena thermophila* e *Paramecium tetraurelia* possuem apenas esse tipo (ODRONITZ; KOLLMAR, 2007).

*T. cruzi* foi identificado como sendo portador das miosinas de classe 1, 13 (encontrada apenas na classe Kinetoplastida) e 7 outras miosinas órfãs denominadas MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE, MyoF e MyoG. Porém, a nomenclatura dessas miosinas como órfãs está sendo questionada, uma vez que elas foram encontradas em outros organismos e não exclusivamente em *T. cruzi* (SOUZA et al., 2018).

A miosina de classe 1 está presente em quase todos os organismos celulares como dito anteriormente. Em *Trypanosoma brucei*, essa proteína foi vista participante de processos de tráfego de vesículas intraparasitária (SPITZNAGEL et al., 2010).

A miosina de classe 13 de *Leishmania major* participa da montagem flagelar e do tráfego intracelular (KATTA et al., 2010).

## 5.2. Motilidade

*T. cruzi* é um microrganismo unicelular pertencente a classe Kinetoplastea, ou seja, possuem cinetoplasto - uma estrutura de DNA mitocondrial condensado, ligadas perpendicularmente ao flagelo nos tripanosomatídeos. Acreditava-se que o cinetoplasto era responsável pela movimentação flagelar, por isso Kinetoplastea é sinônimo de protistas flagelados (STORER; USINGER, 2005).

Existem 3 formas visivelmente bem definidas de *T. cruzi* e todas possuem flagelo: tripomastigota e epimastigota - flagelo longo que emerge da bolsa flagelar, tornando-se livre na região anterior; amastigota - flagelo curto que não emerge da bolsa flagelar, antigamente era considerado sem flagelo. O papel do flagelo de *T. cruzi* é exclusivamente para motilidade, esta locomoção é fundamental para diversas etapas do seu ciclo de vida (CARVALHO, 2017).

O movimento do flagelo se dá graças a um processo de deslizamento entre os microtúbulos do axonema, com participação de uma proteína motora com atividade ATPásica chamada de cinesina, tornando *T. cruzi* extremamente eficiente na sua movimentação flagelar (SOUZA; VIDAL, 2017b).

### 5.3. Pentacloropseudilina

Pentacloropseudilina (PCLP) é inibidor reversível e alostérico da ATPase e da atividade motora de diversas miosinas, essa inibição ocorre devido a uma mudança na dinâmica dessas proteínas (TEIXEIRA et al., 2019).

O tipo de miosina que será inibida, dependerá da concentração desse derivado tricloropirrólico. Em um  $IC_{50}$  (concentração inibitória média) de 1-5 $\mu$ M, há a inibição de miosinas de classe 1, enquanto para miosinas de classe 2, 5, 6 e 7 a concentração de PCLP é acima de 90 $\mu$ M (CHINTHALAPUDI et al., 2011). Em células HeLa, o uso de PCLP para inibir miosina-1c causou uma distribuição anormal do colesterol causada por um bloqueio na fusão lisossomal e consequentemente um defeito na degradação autofágica do mesmo, ou seja, o tráfego intracelular principalmente de lisossomos estava prejudicado (BRANDSTAETTER et al., 2014).

### 5.4. *Charged Multivesicular Body Protein 4B*

Charged multivesicular body protein 4B (CHMP4B) é uma proteína que faz parte do *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), esse complexo contribui para vários eventos: fissão da membrana, formação de corpos multivesiculares (MVBs), formação de exossomos, brotamento viral, abscisão durante a citocinese e reparo da membrana plasmática (HENNE et al., 2013; MCCULLOUGH et al., 2013).

As proteínas da subfamília CHMP4 (A, B e C) estão agrupadas em filamentos anexados à membrana plasmática com o intuito de promover ou estabilizar a brotação externa da mesma, além disso elas também auxiliam na formação de MVBs. Os MVBs contêm vesículas intraluminais (ILVs) que são geradas por invaginação e cisão da membrana plasmática, formando um grande endossomo que posteriormente se fusionará aos lisossomos (WOODMAN, 2016).

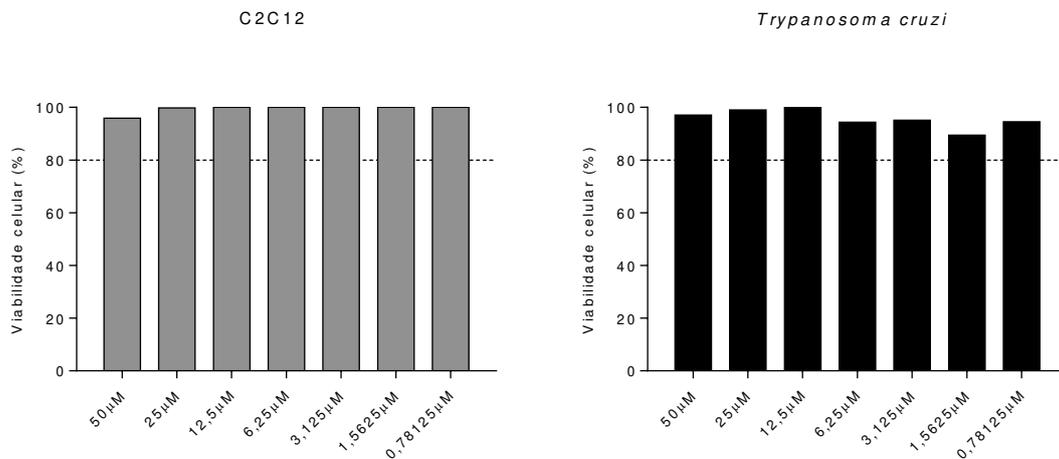
CHMP4B tem mostrado um importante papel na integridade da membrana plasmática. A proteína é recrutada para a membrana plasmática durante processos de necrose e necroptose e, dessa forma consegue sustentar as células e permite sinalização contínua, além de secreção de citocinas (GONG et al., 2017). CHMP4B conseguiu diminuir significativamente o nível de necroptose na microglia, melhorou a recuperação da função neurológica e protegeu contra morte celular após lesão cerebral traumática (ZHAO et al., 2020). Outro estudo envolve a relação de dependência da proteína com os filamentos de actina para realização do seu

transporte intracelular, mostrando que a inibição de miosina-II impede o processo de abscisão durante a citocinese e consequentemente impede que CHMP4B atue nesse processo, ou seja, a proteína não consegue chegar ao local para auxiliar na cisão (WANG et al., 2019).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. PCLP não é citotóxico nem para mioblastos murinos e nem para *T. cruzi*

O teste de citotoxicidade foi realizado em células C2C12 e *T. cruzi* em diversas concentrações de PCLP antes de investigar a influência da Miosina-1 durante o processo de invasão celular. Para mostrar a viabilidade das células e do parasito frente ao tratamento com PCLP, foi realizado o ensaio com resazurina. Nossos resultados mostraram que em 4 horas, nenhuma das concentrações foi citotóxica para nenhuma das duas situações testadas (Figura 4).



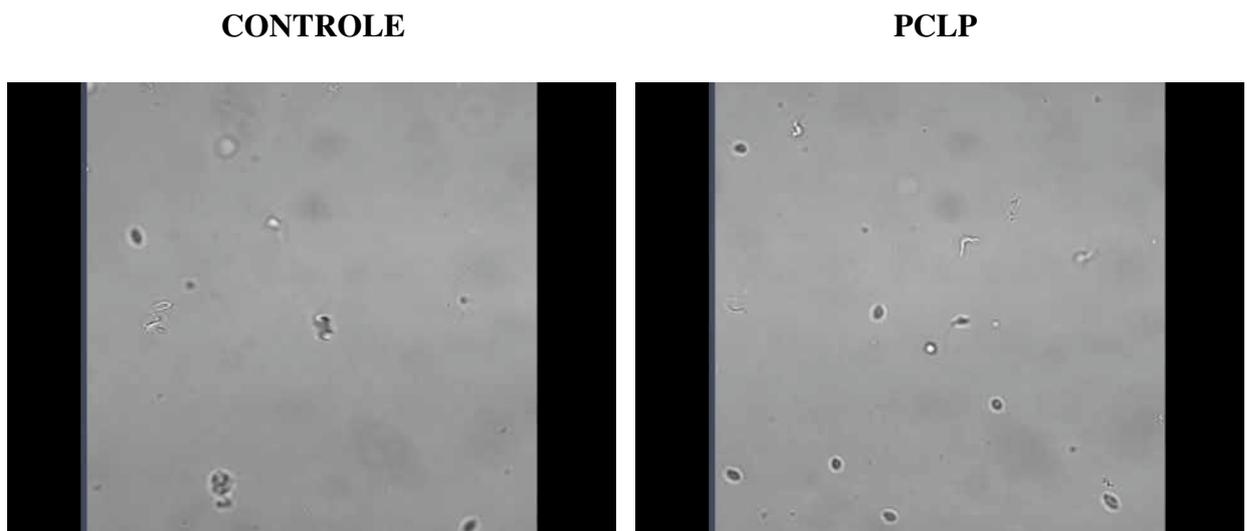
**Figura 4. PCLP não é tóxico para C2C12 e *T. cruzi*.** Células C2C12 e *T. cruzi* foram tratados em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 e 0,78125 μM) de PCLP por 4 horas e não exibiram alterações significativas na viabilidade celular após 4h de tratamento. Diferenças estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's multiple comparisons test.

Teixeira e colaboradores em 2019 demonstraram que células HUVEC (células endoteliais vasculares humanas) tratadas com PCLP também não apresentaram mudanças em sua viabilidade em nenhuma das concentrações testadas por nós (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562 μM), corroborando com o observado nesse trabalho tanto para células de mioblastos murinos, quanto para *T. cruzi*.

Diante disso, para testar a atividade de PCLP nas células e parasitas, escolhemos a concentração de 5 $\mu$ M. Primeiramente por ser uma concentração não-citotóxica para as células e também por ser a concentração ideal para inibir miosina de classe 1 em células de mamífero (CHINTHALAPUDI et al., 2011).

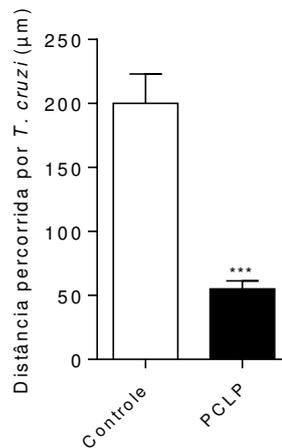
## 6.2. A inibição da miosina-1 de *T. cruzi* reduz motilidade do parasita

Em seguida, a fim de investigar o efeito da inibição de Miosina-1 em *T. cruzi*, os parasitas foram incubados com PCLP (5 $\mu$ M) por 1 hora. A avaliação da movimentação flagelar dos mesmos foi feita através de vídeos produzidos no microscópio de varredura confocal (**Vídeo 1**: CTRL + clique no vídeo para assistir). Conseguimos observar que parasitas tratados com o inibidor apresentaram uma movimentação mais lenta em comparação aos não tratados.



**Vídeo 1 – A inibição de miosina-1 compromete a motilidade de *T. cruzi*.** Após 1 hora de tratamento foi realizado um vídeo qualitativo para observação da motilidade de *T. cruzi* tratado (PCLP) ou não (Controle) com inibidor de miosina-1. Quando comparado ao grupo controle percebemos que os parasitas se movimentam de maneira menos intensa.

O tratamento com o inibidor de miosina afeta a motilidade de *T. cruzi*, passa de um movimento intenso para mais lento e como consequência deste fato, começa a percorrer distancias menores (**Figura 5**). A análise da distância foi realizada com o software Image J.



**Figura 5. A inibição de miosina-1 em *T. cruzi* compromete a distância percorrida pelo parasita.** Após 1 hora de tratamento foi realizado um vídeo para análise da motilidade de *T. cruzi* e essa distância foi mensurada através do *software* Image J. Quando comparado ao grupo não tratado, observamos que a inibição de Miosina-1 compromete a distância percorrida pelo parasita. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Finkelsztejn e colaboradores em 2015, alteraram a motilidade de *T. cruzi* com anticorpo anti-TcTLE, sendo TcTLE um peptídeo importante para a motilidade do parasita, e observaram a velocidade flagelar reduzida em relação aos parasitas não tratados com esse anticorpo. Mesmo que sejam parâmetros de observação diferentes, como a utilização de um anticorpo e não de um inibidor e a análise da velocidade flagelar ao invés da distância percorrida pelo parasita. Assim como nesse trabalho, o objetivo final era influenciar negativamente na movimentação de *T. cruzi* e analisar essa influência durante o processo de infecção.

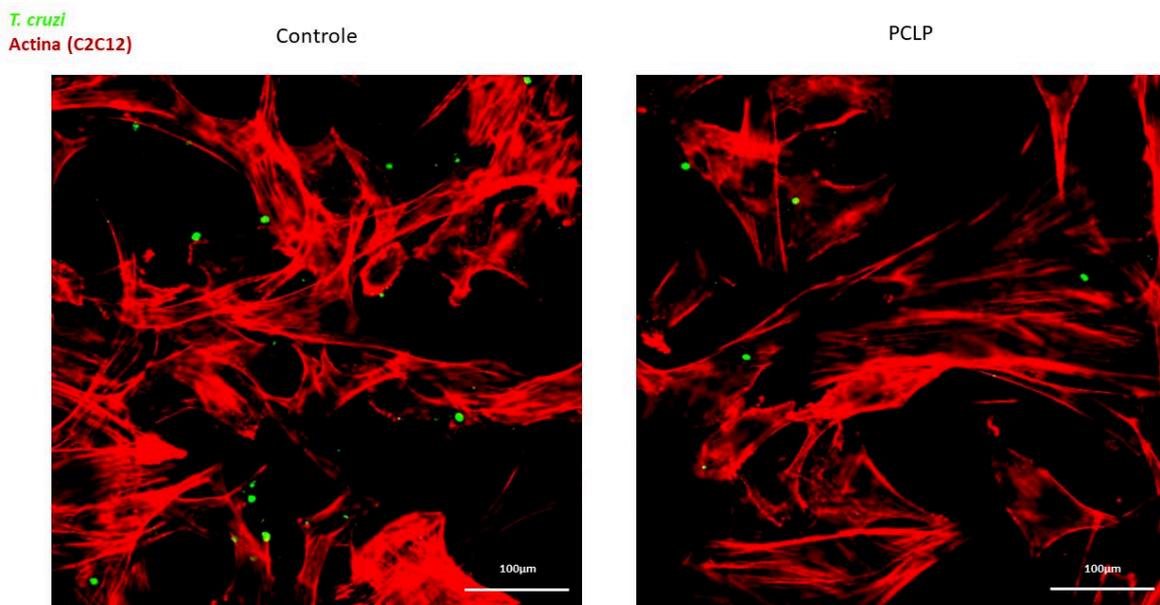
Outro trabalho mostra o efeito da suramina (afeta a síntese e distribuição de proteínas do citoesqueleto) em tripomastigotas de *T. cruzi*, causando uma modificação morfológica de descolamento entre o flagelo e o corpo celular, além de alterar a motilidade do parasita (BISAGIO et al., 2006). O princípio da suramina está diretamente relacionado ao que observamos com PCLP, ambos tratamentos interferem em proteínas do citoesqueleto do parasita, causando alterações em sua motilidade.

O parasita depende de seus movimentos flagelares para conseguir chegar a célula hospedeira e realizar sua invasão, visto que é um parasita intracelular obrigatório. Uma vez que essa movimentação está comprometida, investigamos quais outras etapas do processo de invasão estariam sendo afetadas.

### 6.3. Miosina-1 está diretamente ligada à capacidade de *T. cruzi* em aderir à célula

A interação entre *T. cruzi* e células hospedeiras podem ser dividida em três etapas: adesão ou reconhecimento, sinalização e invasão. A adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes nas duas células envolvidas: o parasita e seu hospedeiro. Portanto, a adesão é um processo mediado por receptor, restrito a domínios de membrana. Nem toda forma tripomastigota que adere a uma célula hospedeira invade ou é fagocitada.

Após observar a dificuldade na motilidade flagelar frente à inibição da miosina-1. Seguimos a análise do impacto com o ensaio de adesão celular que é o primeiro contato célula-hospedeiro prévio à invasão. Células foram fixadas, *T. cruzi* foi colocado para invadi-las e depois realizados os ensaios de imunofluorescência e Giemsa. O bloqueio de Miosina-1 do parasita também dificulta a sua capacidade em aderir a célula hospedeira. Qualitativamente observamos esse perfil em um ensaio de imunofluorescência, ao tratarmos com PCLP a aderência de tripomastigotas em C2C12 fica defasada em relação ao controle (não tratado) (**Figura 6**).

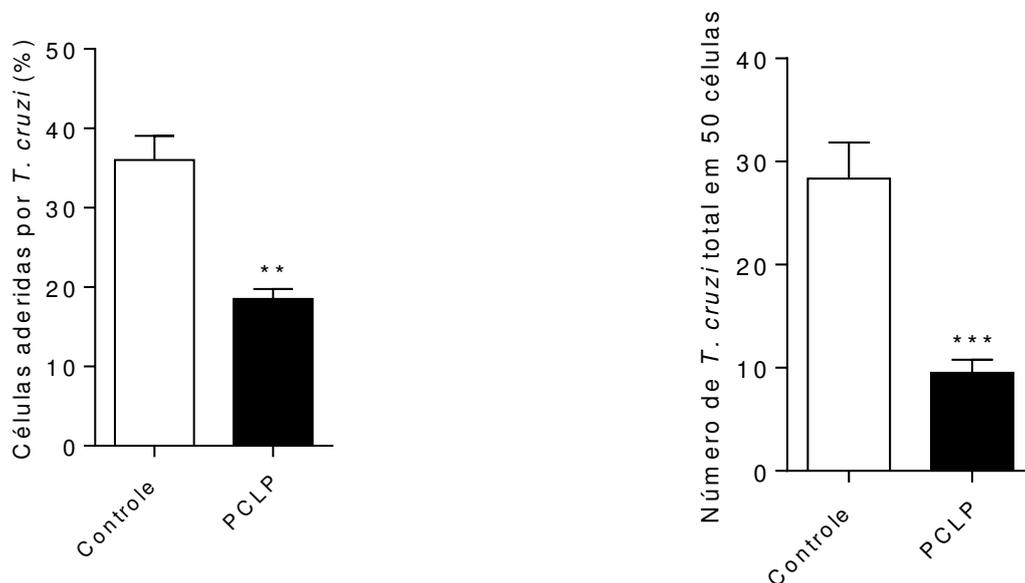


**Figura 6.** Adesão de *T. cruzi* em células C2C12 é prejudicada pelo tratamento com PCLP. Após o ensaio de adesão e marcação com fluoróforos, foi possível observar que o tratamento de *T. cruzi* com PCLP limitou o número de parasitas aderidos na superfície de mioblastos murinos em comparação ao grupo controle (não tratado). Essa imagem é de representação qualitativa. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). *T. cruzi*: marcação Anti-*T. cruzi* em verde. Actina: marcação da faloidina em vermelho. Escala 100µm.

A análise quantitativa dessas imagens também foi realizada por imunofluorescência e Giemsa. Dessa forma analisamos a quantidade de células com parasitas aderidos em sua

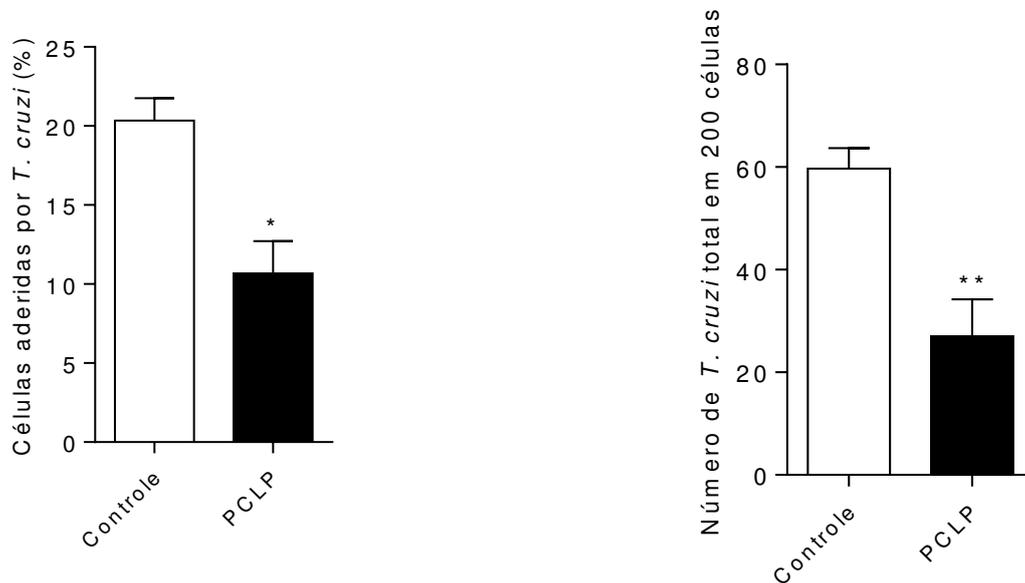
superfície (porcentagem) e a quantidade de parasitas totais que conseguiram obter êxito na aderência.

No ensaio de imunofluorescência, ao bloquear a miosina-1 de *T. cruzi*, a porcentagem de células com parasitas aderidos foi significativamente menor em contraste a células que foram infectadas com parasitas sem esse bloqueio. O mesmo perfil foi observado na quantidade de parasitas totais que conseguiram aderir a células, em 50 células contadas quando *T. cruzi* foi tratado com o inibidor sua taxa de adesão foi bem menor em comparação aos não tratados (**Figura 7**).



**Figura 7. O bloqueio de Miosina-1 em *T. cruzi* reduz o número de células com parasitas aderidos e o número de parasitas totais.** Após o ensaio de adesão com parasitas tratados com PCLP e não tratados (controle), foram marcados com anticorpos conjugados com fluoróforos e analisados em microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). *T. cruzi*: marcação Anti-*T. cruzi* em verde. Actina: marcação da faloidina em vermelho. O primeiro gráfico (esquerda) mostra a porcentagem de células aderidas pelos parasitas e o segundo (direita) o número de parasitas totais contados em 50 células. Em todos os gráficos observamos que o tratamento dos tripomastigostas prejudicou significativamente o processo de aderência de *T. cruzi* em C2C12. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Além do ensaio de imunofluorescência, realizamos o mesmo ensaio com coloração de Giemsa para confirmação do padrão de adesão conforme a **Figura 8**. E vimos o mesmo perfil observado anteriormente, a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas internalizados foi prejudicado em parasitas tratados com PCLP em detrimento dos parasitas do grupo controle.



**Figura 8.** *T. cruzi* tratado com PCLP reduz o perfil de adesão no ensaio de Giemsa. Após as células serem fixadas, os parasitas do grupo controle (não tratado) e PCLP infectaram as células C2C12 e depois foi realizada a coloração com Giemsa e analisados em microscopia ótica. O primeiro gráfico (esquerda) mostra a porcentagem de células aderidas pelos parasitas e o segundo (direita) o número de parasitas totais contados em 200 células. Em todos os gráficos observamos que o tratamento dos tripomastigostas prejudicou significativamente o processo de aderência de *T. cruzi* em C2C12. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Estudos envolvendo processo de adesão são frequentes não apenas para *T. cruzi*, mas também para outros tipos de parasitas, como *Toxoplasma gondii*. Por exemplo, *T. cruzi* adere menos em células com expressão reduzida de galectina-3 (KLESHCHENKO et al., 2004) e taquizoítos de *T. gondii* tratados com toxina BnSP-7 antes da interação com as células, a adesão do parasita também foi significativamente reduzida (BORGES et al., 2016). Inibir a adesão do parasita seria uma das melhores maneiras de inibir o desenvolvimento da doença, pois, como consequência, teríamos menos invasão e progressão.

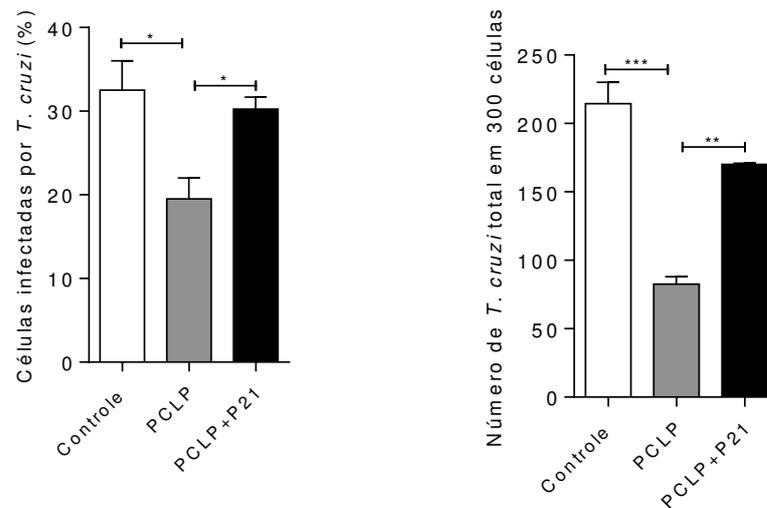
Vimos que a adesão é prejudicada após a inibição da miosina-1 de *T. cruzi*. Após o processo de adesão dos parasitas intracelulares, temos o processo de sinalização para a célula hospedeira. *T. cruzi* é conhecido por liberar diversas proteínas nessa etapa que auxiliam na sua invasão e nosso grupo de estudo tem um grande empenho em caracterizar todas as funções de P21 de *T. cruzi*. Desse modo, buscamos investigar se a miosina-1 do parasita estaria envolvida com a liberação de P21.

#### **6.4. rP21 de *T. cruzi* restaura a capacidade infectiva do parasita quando o parasito é tratado com PCLP**

Após observações sobre o bloqueio e Miosina-1 de *T. cruzi* prejudicar as etapas do processo de invasão do parasita. Além da movimentação flagelar, investigamos se a inibição estaria atrapalhando no processo de sinalização do parasita, ou seja, a secreção de proteínas importantes para esse processo, como a P21. P21 é uma proteína secretada por *T. cruzi* e sua forma recombinante (rP21) promove a invasão celular do parasita e atua como um indutor de fagocitose, ativando a polimerização de actina na célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017).

A partir dessa premissa, realizamos o ensaio de invasão de *T. cruzi* em C2C12 por 2 horas (Giemsa). No grupo controle não realizamos nenhum tipo de tratamento, no grupo PCLP realizamos os tratamentos dos parasitas 1 hora prévia a invasão e no grupo PCLP+P21 realizamos o bloqueio de miosina-1 nos parasitas 1 hora antes da invasão e durante o processo de invasão adicionamos 40µg/ml de P21 para analisar se haveria alguma influência na capacidade infectiva de *T. cruzi*. Para isso, analisamos a porcentagem de células infectadas e o número total de parasitas em 300 células contadas.

Podemos observar na **Figura 9** que o bloqueio de miosina-1 em *T. cruzi* reduz a porcentagem de células infectadas pelo parasita e também o número total dos mesmos que efetivamente invadiram as células C2C12, comparados ao grupo controle. Porém, quando biodisponibilizamos 40µg/ml de rP21, durante o processo de invasão, houve uma retomada da quantidade de células infectadas e do número total de parasitas que invadiram os mioblastos murinos, desta forma não observamos diferença significativa com o grupo controle (não tratado).



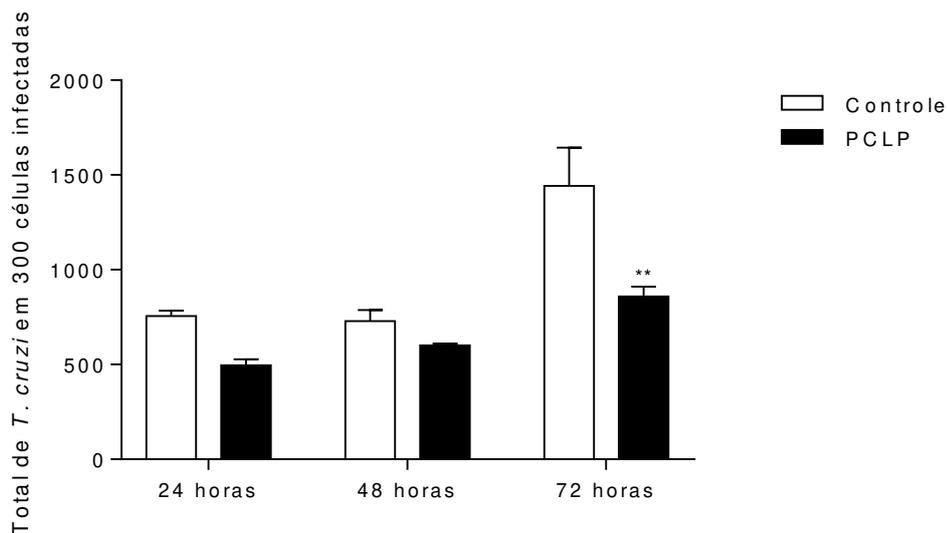
**Figura 9. O tratamento com a proteína recombinante 21 de *T. cruzi* retoma o perfil de invasão prejudicado pelo bloqueio de miosina-1.** Realizamos o ensaio de invasão de *T. cruzi* em C2C12 por 2 horas. No grupo controle não realizamos nenhum tipo de tratamento, no grupo PCLP realizamos os tratamentos dos parasitas 1 hora antes da invasão e no grupo PCLP+P21 realizamos o bloqueio de miosina-1 nos parasitas 1 hora antes da invasão e durante o processo de invasão adicionamos 40µg/ml de P21. O grupo PCLP apresentou redução da porcentagem de células infectadas pelo parasita e também o número total dos mesmos que conseguiu efetivamente invadir as células C2C12 quando comparados ao grupo controle. Porém, a presença de P21 durante o processo de invasão, retomou a quantidade de células infectadas e do número total de parasitas que invadiram os mioblastos murinos observadas no grupo controle. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Em um estudo feito por Rodrigues e colaboradores (2012), mostrou que a rP21 auxilia no aumento da fagocitose de partículas inertes assim como de parasitas intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii*. Sendo C2C12 uma célula não fagocítica, podemos inferir que quando biodisponibilizamos rP21 no momento da invasão do parasita e há um aumento nos parâmetros de invasão, a proteína não estimula a fagocitose e sim a capacidade infectiva do parasita que foi perdida pela possível retenção molecular de P21 intraparasitária causada pela inibição de miosina.

Deste modo, conseguimos analisar que a miosina-1 de *T. cruzi* influencia em etapas do processo de invasão do parasita, como a motilidade, adesão, sinalização até a invasão em si fica prejudicada. Após a invasão, o parasita sai da forma tripomastigota e se transforma em amastigota, conhecida como uma das formas replicativas do parasita. *T. cruzi* se multiplica até lizar a célula hospedeira, com isso, investigamos se a inibição da miosina-1 interferiria a longo prazo na multiplicação.

### 6.5. A inibição da miosina de *T. cruzi* influencia tardiamente no processo de multiplicação

Uma vez que a inibição da miosina interfere na liberação de proteínas secretadas por *T. cruzi* que auxiliam em seu processo de invasão, investigamos se a longo prazo haveria interferência no processo de multiplicação do parasita. *T. cruzi* tratado (PCLP) ou não (Controle) invadiram células C2C12 e após 2 horas retiramos os tripomastigotas não invasores e aguardamos a multiplicação dos amastigotas intracelulares por 24, 48 e 72 horas, realizamos a coloração de Giemsa para analisar os resultados. Apesar de ser um inibidor reversível, vimos com 72 horas a multiplicação dos amastigotas foi prejudicada (**Figura 10**), provavelmente devido à retenção de P21 que também auxilia nesse processo.



**Figura 10. A longo prazo PCLP ainda é capaz e interferir no processo de infecção.** Realizamos o ensaio de multiplicação e após 2 horas de invasão com parasitas tratados (PCLP) ou não (Controle) com o inibidor de miosina, retiramos os tripomastigotas que não invadiram e aguardamos 24, 48 e 72 horas para contagem de amastigotas intracelulares. Após 72 horas, a inibição da miosina de *T. cruzi* começa a interferir negativamente na multiplicação do parasita em células infectadas. Diferenças significativas foram determinadas por 2way ANOVA e teste de múltiplas comparações Sidak.

Existem diversas moléculas sendo estudadas que interferem negativamente nos processos de multiplicação de *T. cruzi*, como Vismione B (medicamento utilizado na África no tratamento de Chagas), deidroepiandrosterona (DHEA - hormônio esteróide), pioquelina (produto produzido por *Pseudomonas aeruginosas*), entre outros, porém eles são acrescentados

durante o momento da invasão, não permitindo evidenciar se a influência é estrita na células e/ou parasita (SANTOS et al., 2007; SASS et al., 2019; SASS et al., 2020). Entretanto, existe um estudo com Bromopalmitato que inibe a estabilização de proteínas e regulação de atividades enzimáticas de *T. cruzi*, com o tratamento prévio à infecção eles conseguiram observar além de alterações morfológicas do parasita, assim como nós observamos, também observaram que a infectividade do parasita foi diminuída, porém eles não analisaram se essa inibição interferiria a longo prazo no processo de multiplicação dos amastigotas intracelulares (BATISTA et al., 2018).

Até o momento, o foco do trabalho tem sido em identificar o papel da Miosina-1 de *T. cruzi*, porque apesar de sabidamente expressar algumas classes de miosina (SOUZA et al., 2018) existem questionamentos sobre a função efetiva da mesma durante o processo de invasão. Com os resultados, podemos concluir que miosina-1 de *T. cruzi* é capaz de influenciar além da motilidade flagelar do parasita, a adesão, a sinalização (a liberação de proteínas essenciais ao processo de infecção como a P21) e o processo de invasão celular em si.

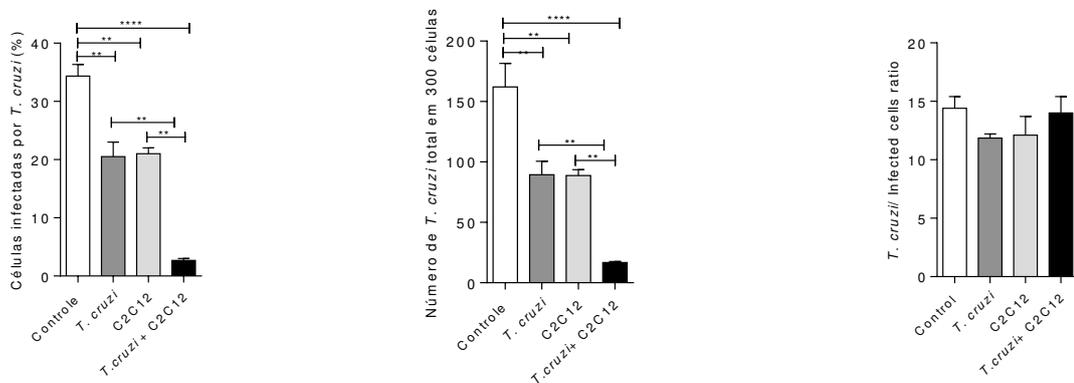
O papel da miosina como proteína motora ligada a actina em células eucarióticas e sua relação com diversos papéis moleculares como: contração muscular, citocinese, migração celular e transporte intracelular, estão melhor elucidados quando comparados as funções da mesma em Tripanosomatídeos. Porém, não sabemos ainda como a Miosina-1 modula a invasão e o transporte intracelular durante a infecção por *T. cruzi*. A partir de agora, continuamos nossa investigação sobre o inibidor de miosina a nível celular.

#### **6.6. Processo de invasão celular por *T. cruzi* é prejudicado com a inibição de miosina do parasita e da célula**

Unindo o pensamento de inibir a miosina de *T. cruzi*, inibimos a miosina de C2C12 para realizar o ensaio de invasão por 2 horas com Giemsa e observar se a invasão de tripomastigotas estaria prejudicada. Além disso, fizemos uma dupla inibição para observar se o efeito do PCLP era cumulativo, ou seja, mecanismos diferentes de atuação da miosina-1 do parasita e da célula causariam algum efeito no processo da invasão.

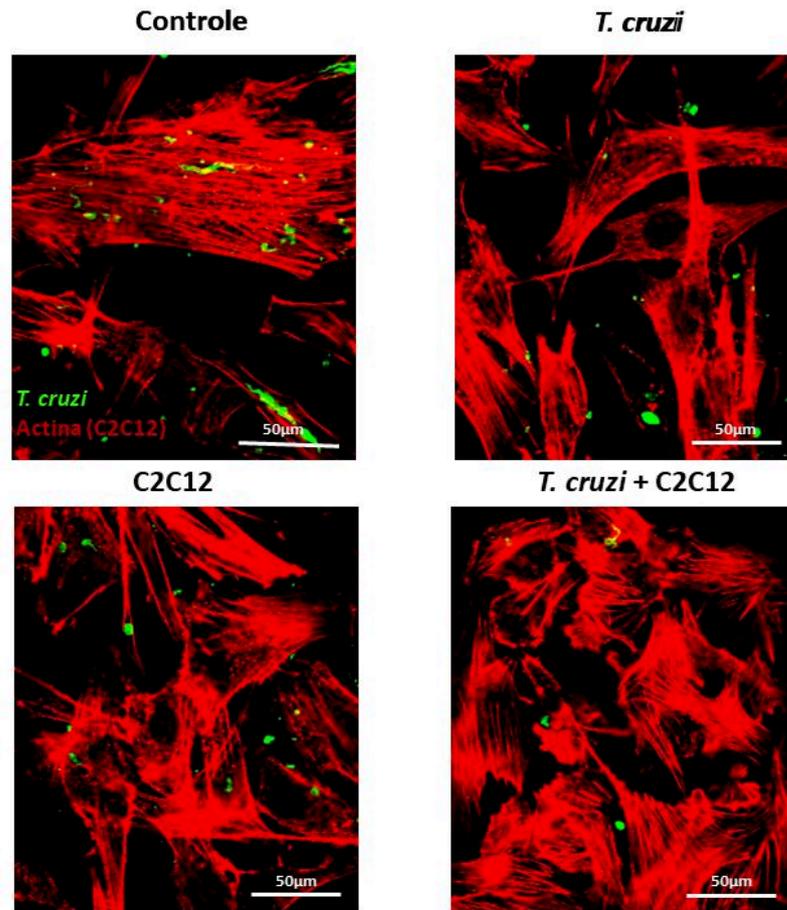
Após 2 horas de invasão analisamos a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas totais em 300 células, vimos que ao tratar *T. cruzi* e C2C12 com PCLP separadamente houve um declínio no processo de invasão quando comparados ao grupo controle (não tratado), mas não houve diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, quando realizamos uma dupla inibição da miosina-1, tanto do parasita quanto das células, a redução dos fatores

analisados foi 4x menor comparado a inibição única (ou pelo parasita ou pela célula) (**Figura 11**). Apesar de todas as diferenças encontradas, o número de parasitas em cada célula infectada se manteve o mesmo para todos os tratamentos, inclusive o não tratado.



**Figura 11. Inibição de Miosina-1 é cumulativa em tratamento duplo.** Realizamos o ensaio de invasão por 2 horas com método de Giemsa. Tratamentos únicos com PCLP apenas de *T. cruzi* ou apenas de C2C12, tratamento duplo (tanto do parasita quanto da célula) e também sem tratamento (controle). O tratamento único em *T. cruzi* e C2C12 reduziu o número de células infectadas e também o número total de parasitas internalizados em 300 células. O tratamento duplo, acumulou os efeitos únicos e mostrou uma redução ainda mais significativa. Diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

Observamos em uma imagem representativa realizada por meio de ensaio de imunofluorescência de cada uma das situações: controle (não tratado), *T. cruzi* (apenas parasita tratado com PCLP), C2C12 (apenas as células tratadas com PCLP) e *T. cruzi*+C2C12 (duplo tratamento com PCLP) (**Figura 12**).



**Figura 12. Tratamento duplo de *T. cruzi* e C2C12 com PCLP prejudica o processo de invasão.** Realizamos o ensaio de invasão por 2 horas com RIFI, com tratamentos únicos com PCLP apenas de *T. cruzi* ou apenas de C2C12, tratamento duplo (tanto do parasita quanto da célula) e também sem tratamento (controle). O tratamento único em *T. cruzi* e C2C12 reduziu o número de células infectadas e também o número total de parasitas internalizados em 300 células. O tratamento duplo, acumulou os efeitos únicos e mostrou uma redução ainda mais significativa. Essa imagem é de representação qualitativa. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). *T. cruzi*: marcação Anti-*T. cruzi* em verde. Actina: marcação da faloidina em vermelho. Escala 50µm.

Um trabalho demonstrou que a inibição da cinética lisossomal na célula hospedeira pela molécula de superfície gp90 de *T. cruzi*, regula negativamente a invasão do parasita (RODRIGUES et al., 2017). O mesmo foi observado em nosso trabalho com a inibição da miosina-1, porém o parasita ainda consegue invadir por outros mecanismos (Andrews, 2019). A miosina faz parte do citoesqueleto das células e age em conjunto com a actina para estruturação celular e movimentação vesicular intracelular, quando inibida na C2C12 ela também prejudica o processo de invasão do parasita.

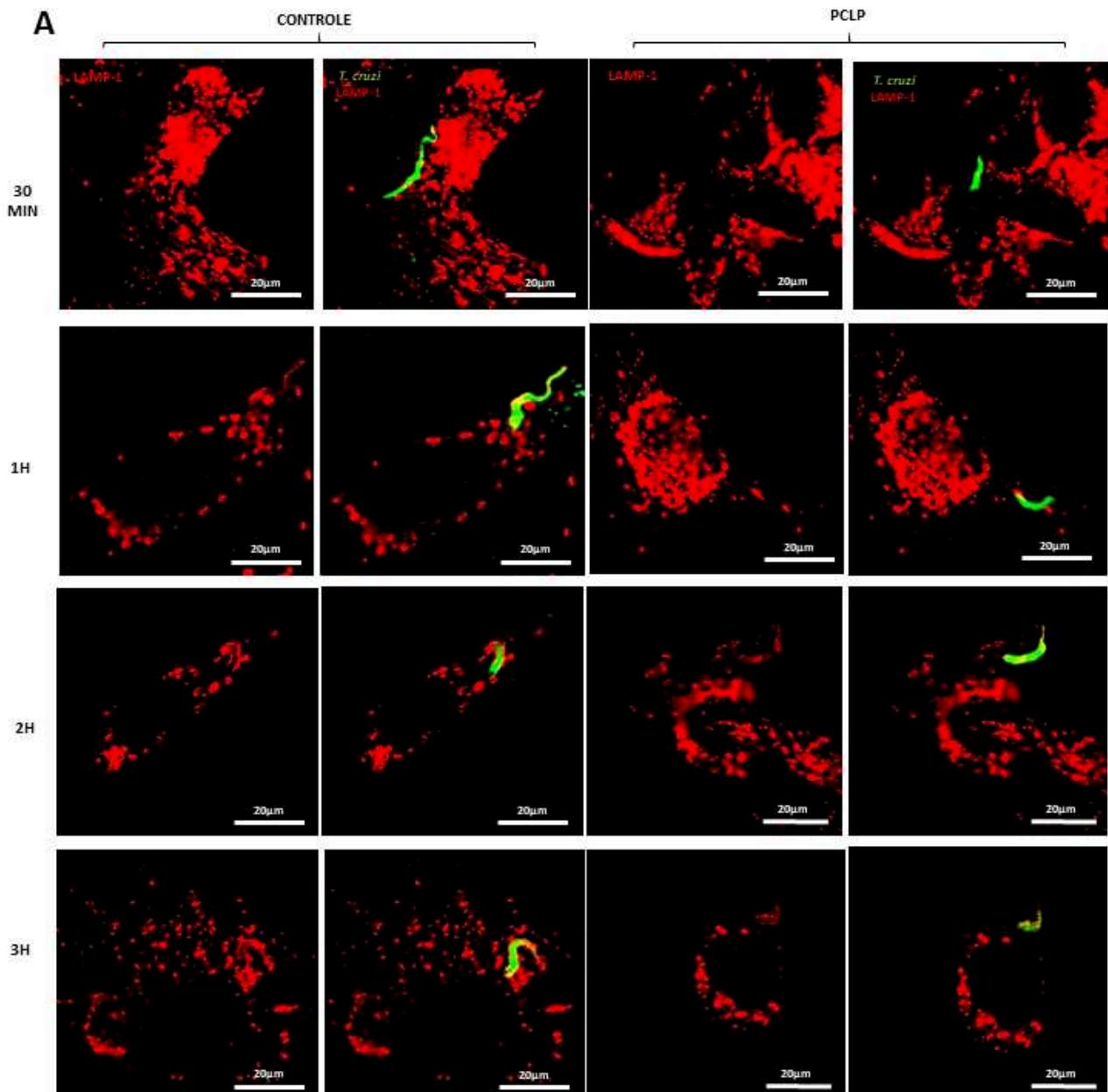
Com isso, acreditamos que os mecanismos de ação de miosina em *T. cruzi* e C2C12 agem de maneiras diferentes, portanto possuem um efeito acumulativo e como elucidamos

alguns eventos envolvidos com a miosina-1 do parasita, iremos elucidar agora os mecanismos envolvidos no bloqueio da miosina-1 de C2C12.

### **6.7. Infecção por *T. cruzi* é menor em mioblastos murinos tratados com PCLP devido ao seu *delivery* de lisossomos estar prejudicado**

De acordo com os resultados anteriores, o tratamento de *T. cruzi* com PCLP, prejudica seu processo de invasão, mostramos que esse prejuízo estava relacionado à uma menor motilidade flagelar e a um prejuízo na liberação de P21. A partir de agora, mostraremos os mecanismos envolvidos na diminuição da invasão quando inibimos a miosina-1 de C2C12.

Realizamos um ensaio de cinética de lisossomos em 3, 2, 1 hora e 30 minutos com RIFI e tripomastigotas invadiram células não tratadas (controle) e tratadas (PCLP) com o inibidor de miosina-1. Marcamos LAMP-1 em vermelho (marcador de lisossomos) e *T. cruzi* em verde (anti-*T. cruzi*). A partir das imagens obtidas com a cinética conseguimos analisar que o tratamento de C2C12 com PCLP prejudica o recrutamento de lisossomos em comparação as células não tratadas (**Figura 13**).

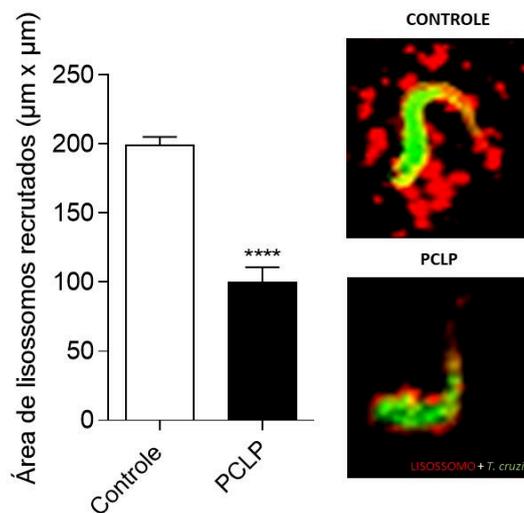


**Figura 13. Cinética de lisossomos é prejudicada após do tratamento de C2C12 com PCLP.** Realizamos um ensaio de cinética de lisossomos em 3, 2, 1 hora e 30 minutos com RIFI e colocamos tripomastigotas para invadir células não tratadas (controle) e tratadas (PCLP) com o inibidor de miosina-1. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). *T. cruzi*: marcação Anti-*T. cruzi* em verde. Lisossomos: marcação de LAMP-1 em vermelho. Escala 20 $\mu$ m.

Os lisossomos são ferramentas chave na invasão por *T. cruzi*, pois liberam ASM que será liberada no local do dano causado (pelos parasitas) na membrana plasmática das células, esse dano será corrigido através da liberação de ASM e formação de endossomos para reparar o mesmo. Se os lisossomos não estão chegando ao local do dano, não há liberação de ASM e essa invasão fica prejudicada, o parasita terá que utilizar de outros mecanismos de invasão (por isso, apesar de ter esse mecanismo prejudicado, ele ainda consegue invadir) (ANDREWS,

2019). Como por exemplo, a partir da liberação de P21 que se liga ao CXCR4 da célula permitindo o remodelamento do citoesqueleto de actina ao redor do parasita e internalizando-o (esse mecanismo é prejudicado durante o tratamento de *T. cruzi* com PCLP, uma vez que a inibição de miosina do parasita prejudica a liberação de P21) (RODRIGUES et al., 2012).

Para quantificar os resultados obtidos na cinética, calculamos com o Image J a área dos lisossomos recrutados ao redor do parasita em 3 horas de invasão e observamos o quanto a área de lisossomos recrutados é menor após a inibição da Miosina-1 de C2C12 (**Figura 14**).



**Figura 14.** A área de lisossomos recrutados é menor em mioblastos tratados com PCLP. Após 3 horas de invasão em células não tratadas (controle) e tratadas (PCLP) com o inibidor de miosina-1 realizamos o RIFI. Calculamos a área de recrutamento de lisossomos usando o Image J, as imagens laterais (direita) exemplificam o que é considerado área de recrutamento. *T. cruzi*: marcação Anti-*T. cruzi* em verde. Lisossomos: marcação da LAMP-1 em vermelho. Observamos o quanto a área de lisossomos recrutados fica prejudicada com a inibição de miosina-1. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Outros estudos mostram o papel direto de lisossomos no processo de invasão, de forma que o receptor LAMP-2 se liga diretamente com a gp82 de *T. cruzi*, permitindo a formação do vacúolo e entrada do parasita na célula, porém eles não viram o mesmo fenótipo para o receptor LAMP-1, avaliado em nosso trabalho (RODRIGUES, et al., 2019). A partir dessa premissa, o receptor LAMP-1 está envolvido com a liberação enzimática de ASM e subsequente formação de cavéolas para entrada do parasita.

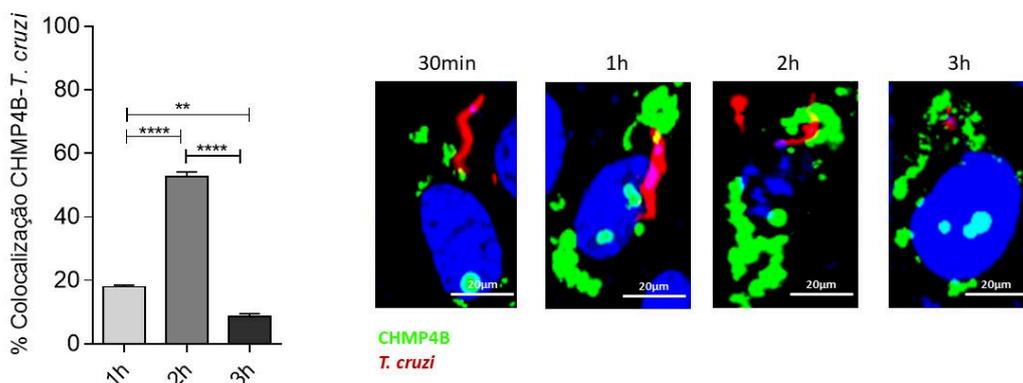
Dessa forma, vimos que em mioblastos murinos o recrutamento e tráfego de lisossomos estava diminuído devido ao bloqueio de Miosina-1, proteína intimamente relacionada do tráfego de vesículas intracelulares. Realizamos métodos moleculares de superexpressão de

moléculas intracelulares para investigar se também estariam sofrendo interferência nesse processo.

### 6.8. A superexpressão de CHMP4B interfere no processo de invasão de *T. cruzi*

CHMP4B componente principal da triagem endossômica necessária para o complexo de transporte III (ESCRT-III), envolvido na formação de corpos multivesiculares (MVBs). Os MVBs contêm vesículas intraluminais (ILVs) que são geradas pela invaginação e cisão da membrana plasmática (limitadora do endossomo) e são entregues principalmente aos lisossomos, permitindo a degradação das proteínas da membrana, como receptores de fatores de crescimento estimulados, enzimas lisossômicas e lipídios, podem fundir-se de volta com a membrana plasmática e liberar seu conteúdo por exocitose. (KATOH et al., 2003). CHMP4B auxilia a promoção ou estabilização da curvatura negativa e a brotação externa (BAIETTI et al., 2012).

Sendo CHMP4B envolvido na formação de MVBs e *T. cruzi* utiliza a formação endossomal a partir da membrana plasmática como um de seus mecanismos para invadir a célula. Realizamos a superexpressão de CHMP4B em mioblastos murinos e tripomastigotas invadiram essas células em uma cinética de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas. Observamos que a molécula colocalizava com o parasita durante o processo de invasão, de modo que há um aumento de localização ao passar do tempo e um pico de ligação entre eles no período de 2 horas de infecção justamente pela formação de endossomos e MVBs, e com 3 horas quando parasito já está no interior da célula, a colocalização decai. (Figura 15).



**Figura 15. Colocalização de CHMP4B com *T. cruzi* durante a cinética de invasão.** Foi realizada a superexpressão de células C2C12 com a molécula CHMP4B e depois a invasão com tripomastigotas de *T. cruzi* em uma cinética de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas. Ao longo da cinética, observamos um aumento na colocalização pela formação de MVBs atingindo um pico com 2 horas de invasão e a partir disso sofre decaimento desse encontro. As imagens laterais (direita) são exemplos de colocalizações encontradas durante o período da cinética.

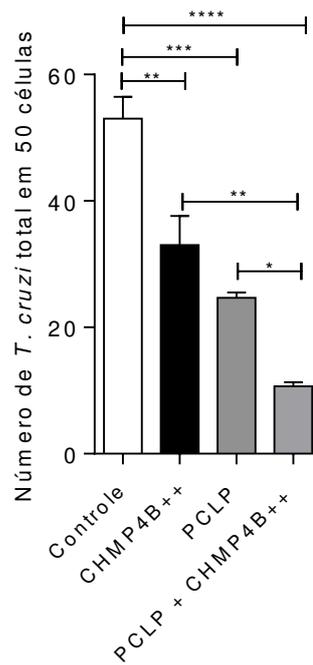
Diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA e pós teste de Tukey. As imagens são de representação qualitativa. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). *T. cruzi*: marcação Anti-*T.cruzi* em vermelho. CHMP4B: molécula superexpressa com marcador FITC (verde). Escala 20µm.

Com esses resultados, vemos que CHMP4B está envolvida no processo de invasão de *T. cruzi*. Sendo uma proteína envolvida nos mecanismos intracelulares de formação de MVBs e, portanto, diretamente relacionada com a posterior ligação de MVBs aos lisossomos. Continuamos a investigação para saber se sua superexpressão estaria diretamente envolvida com o *delivery* de lisossomos na infecção por *T. cruzi* e se a Miosina-1 também exerceria algum papel nesse contexto.

### **6.9. A inibição da miosina intensifica o efeito da superexpressão de CHMP4B na invasão por *T. cruzi***

Primeiramente, realizamos o ensaio de invasão com RIFI para analisar o efeito da superexpressão de CHMP4B na quantidade de parasitas internalizados em comparação ao grupo controle que não foi superexpresso. Observamos que o aumento de CHMP4B em C2C12 diminuiu a quantidade de *T. cruzi* internalizado (**Figura 16**). Acreditamos que esse aumento está relacionado a maior formação de MVBs e, portanto, os lisossomos estariam sendo redirecionados para fusão com os mesmos, em menor quantidade à membrana plasmática para formação de caveolas e conseqüentemente diminuiria entrada do parasita na célula.

Sabemos que ao inibir a miosina-1 de C2C12, o recrutamento lisossomal fica prejudicado, assim como número de parasitas internalizados conforme podemos observar no gráfico (**Figura 16**). Dessa forma, realizamos a superexpressão de CHMP4B prévia ao tratamento com PCLP e depois os parasitas invadiram as células. Apenas a superexpressão já diminui a invasão como dito no parágrafo anterior, devido a retenção de lisossomos se fundindo com MVBs. Quando a superexpressão e a inibição de miosina-1 são feitas no mesmo grupo experimental, a quantidade de parasitas internalizados é ainda mais prejudicada pelo fato dos lisossomos estarem se fusionando aos MVBs juntamente ao fato dos outros disponíveis não conseguirem chegar de forma efetiva na membrana plasmática (**Figura 16**).



**Figura 16. A superexpressão de CHMP4B e inibição de miosina-1 simultaneamente dificultam a entrada de *T. cruzi* em C2C12.** Ensaio de invasão realizado através de RIFI, sendo grupo controle: sem tratamento e sem superexpressão, CHMP4B ++: C2C12 superexpressando CHMP4B, PCLP: C2C12 tratado com inibidor de miosina-1 e PCLP + CHMP4B++: C2C12 superexpressando CHMP4B e posteriormente tratada com PCLP. Todas as células foram infectadas. A superexpressão e o tratamento com PCLP sozinhos reduzem a quantidade de parasitas internalizados, quando há uma junção dos dois, o efeito sofre piora significativa. Diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

## CAPÍTULO 2

A AUSÊNCIA DE DECTINA-1 EM MACRÓFAGOS DIMINUI A INASÃO E  
MULTIPLICAÇÃO CELULAR DE *T. CRUZI IN VITRO*

## 7. INTRODUÇÃO

### 7.1. Dectina-1

Dectina-1 é um receptor lectínico transmembrana do tipo C que se liga a carboidratos, participando de eventos importantes relacionados a imunidade e homeostase. Também conhecido como CLEC-7A, é predominantemente expresso em células mielóides, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (BROWN; CROCKER, 2016). O carboidrato reconhecido por esse receptor é o  $\beta$ -glucano, encontrado nas paredes celulares de plantas e fungos, mas também foi relatado seu reconhecimento por uma proteína chamada de tropomiosina, encontrada em artrópodes, e outros ligantes ainda não identificados encontrados em micobactérias e *Leishmania* (BROWN; CROCKER, 2016; LIMA-JUNIOR et al., 2017; GOUR et al, 2018).

De forma geral, Dectina-1 tem se mostrado importante em doenças relevantes como micoses, colites, obesidade, hepatite alcoólica, alergias e oncogênes. Apesar de ser um receptor primariamente conhecido como “de carboidrato” não é exclusivo, estudos revelam que além da sua capacidade de se ligar a  $\beta$ -glucanos, também de ligam a troponina, *Mycobacterium*, *Leishmania*, galectina e imunoglobulinas galactosiladas. E são expressas em uma alta variedade celular que vai desde monócitos, macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer, células de Langerhans, até células B, basófilos e eosinófilos (TONE et al., 2019).

A ligação com o receptor Dectina-1 pode desencadear a indução ou regulação de diversos processos celulares, incluindo fagocitose, explosão respiratória, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, autofagia, maturação de células dendríticas e apresentação de antígenos, ativação de inflamassoma (incluindo o NLRP3 e caspase-8), e a produção de eicosanóides, citocinas e quimiocinas (BROWN; CROCKER, 2016).

Dectina-1 foi inicialmente descoberto participando da imunidade contra fungos como *Aspergillus*, *Candida* e *Pneumocystis* a partir da sua capacidade de se ligar a seus  $\beta$ -glucanos (BROWN; CROCKER, 2016). Outra função importante desse receptor está relacionada a manutenção da homeostase gastrointestinal e agravamento da colite, por meio do reconhecimento de fungos específicos na microbiota e  $\beta$ -glucanos derivados de alimentos (DRUMMOND et al., 2016; KAMIYA et al., 2018; TAKAGAWA et al., 2018).

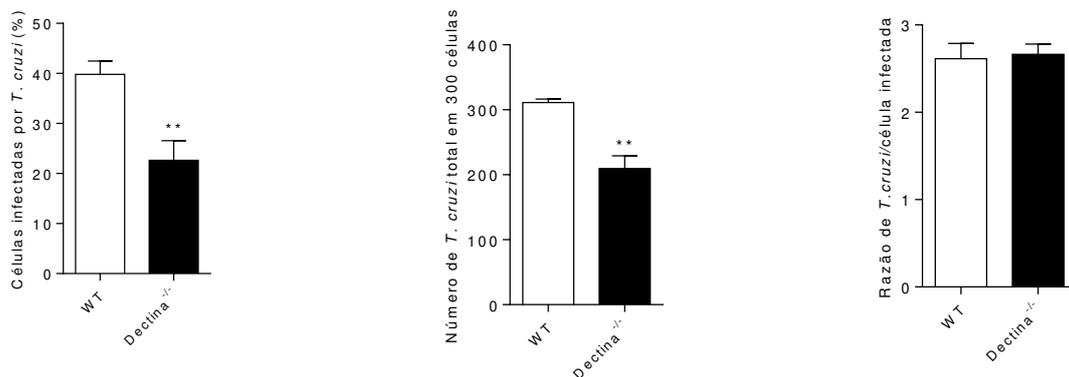
Mais recentemente Dectina-1 tem sido associada à patologia das respostas alérgicas, porque apesar de promover respostas imunes do tipo Th1 e Th17, também pode gerar respostas imunes Th2 através da produção de prostaglandinas E2 e regulação de IL-22 e IL-33 (ITO et

al., 2017; GOUR et al., 2018; KAISAR et al., 2018). Também medeia atividades de proteção ao suprimir inflamação mediada por TLR4 e promovendo imunidade Th9 (ZHAO et al., 2016; BROWN et al., 2018).

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

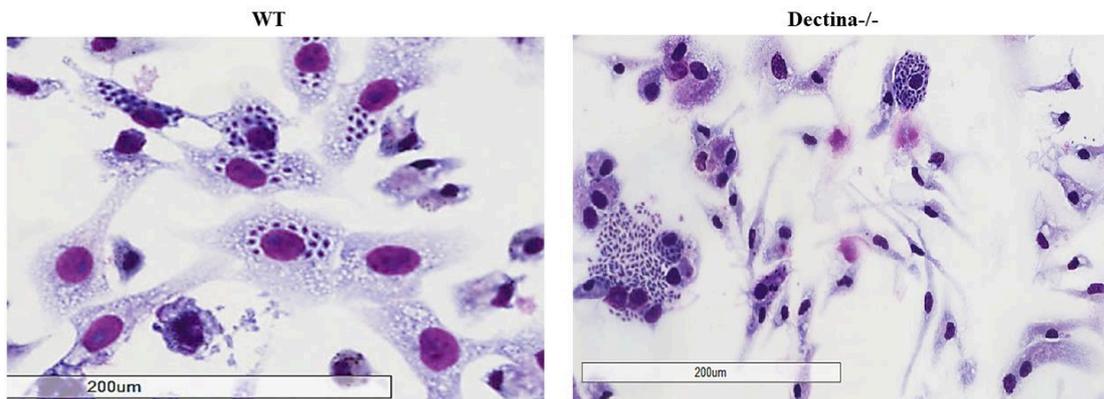
### 8.1. Dectina-1 apresenta um papel fundamental na invasão de *T. cruzi*

Com o intuito de analisar o efeito da ausência do receptor Dectina-1 no hospedeiro durante a invasão celular por *T. cruzi*, utilizamos macrófagos peritoneais Dectina-1<sup>-/-</sup> e WT como controle. Neste experimento *in vitro*, observamos uma redução nas taxas de invasão quando comparadas ao controle: analisamos a porcentagem de células infectadas e a quantidade de parasitas internalizados. Porém, não houve mudança no número de parasitas por células infectada (Figura 17).



**Figura 17.** A ausência de Dectina-1 prejudica o processo de invasão por *T. cruzi*. Macrófagos peritoneais WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> foram infectados e corados com Giemsa. Foram analisadas: a porcentagem de células infectadas e a quantidade total de parasitas em 300 células, observamos um declínio em ambos. Entretanto, a razão de *T. cruzi* por células infectada, se manteve nos dois grupos. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Seguimos a análise com imagens representativas desse ensaio que ilustram qualitativamente o fenômeno de redução das taxas de invasão observado pelos gráficos anteriores. (Figura 18).



**Figura 18. Receptor Dectina-1 tem impacto significativo no processo de invasão por *T. cruzi* em macrófagos.** Imagem representativa de macrófagos peritoneais WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> infectados por *T. cruzi* e corados com Giemsa. Imagem obtida com scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT- Leica).

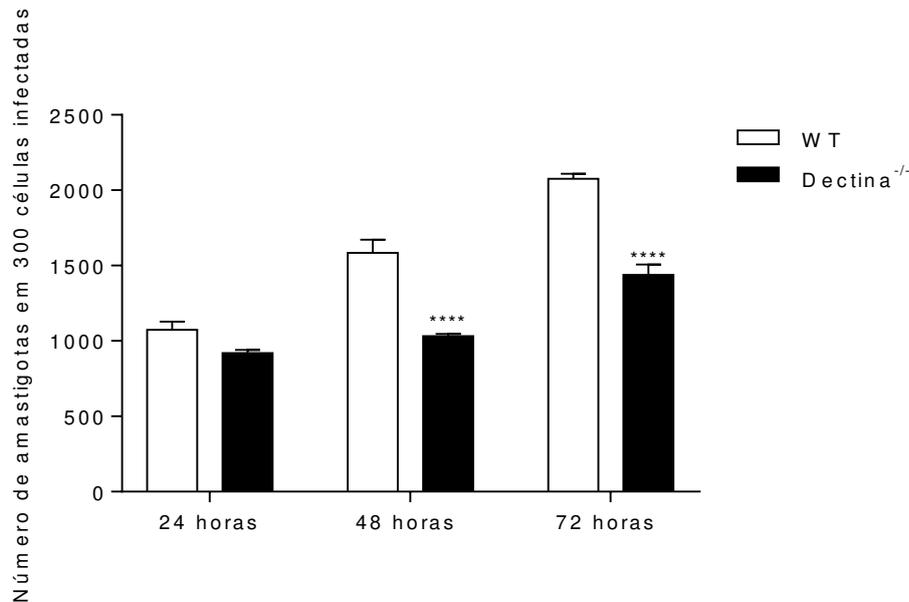
Nos últimos anos, Dectina-1 vem se mostrando importante não apenas para imunidade contra fungos, mas também para parasitas intracelulares. Em um trabalho de Lima-Junior e colaboradores (2017), eles observaram que a ausência de Dectina-1 aumentava a invasão por *Leishmania amazonensis*, diferentemente do que observamos neste trabalho. Apesar de pertencerem a mesma ordem Trypanosomatida, o receptor lectínico participa de forma a restringir a invasão de *L. amazonensis*, enquanto contribui para a invasão de *T. cruzi*. Esse mesmo perfil, é observado para dois Apicomplexa da mesma ordem Eucoccidiorida, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, na qual de acordo com Silva e colaboradores (2017) *N. caninum* apresenta o mesmo perfil observado em *T. cruzi*, eles observaram uma redução da infectividade na ausência de Dectina-1, portanto o receptor possui um papel importante no desenvolvimento da infecção por esses dois parasitas intracelulares. Entretanto, o mesmo estudo mostra que Dectina-1 não influencia no processo infectivo de *T. gondii*.

Além do processo de invasão, analisamos a continuidade da infecção a partir da transformação de tripomastigotas em amastigotas intracelular e consequente replicação das mesmas.

## **8.2. A ausência de Dectina-1 prejudica o processo de multiplicação intracelular de *T. cruzi***

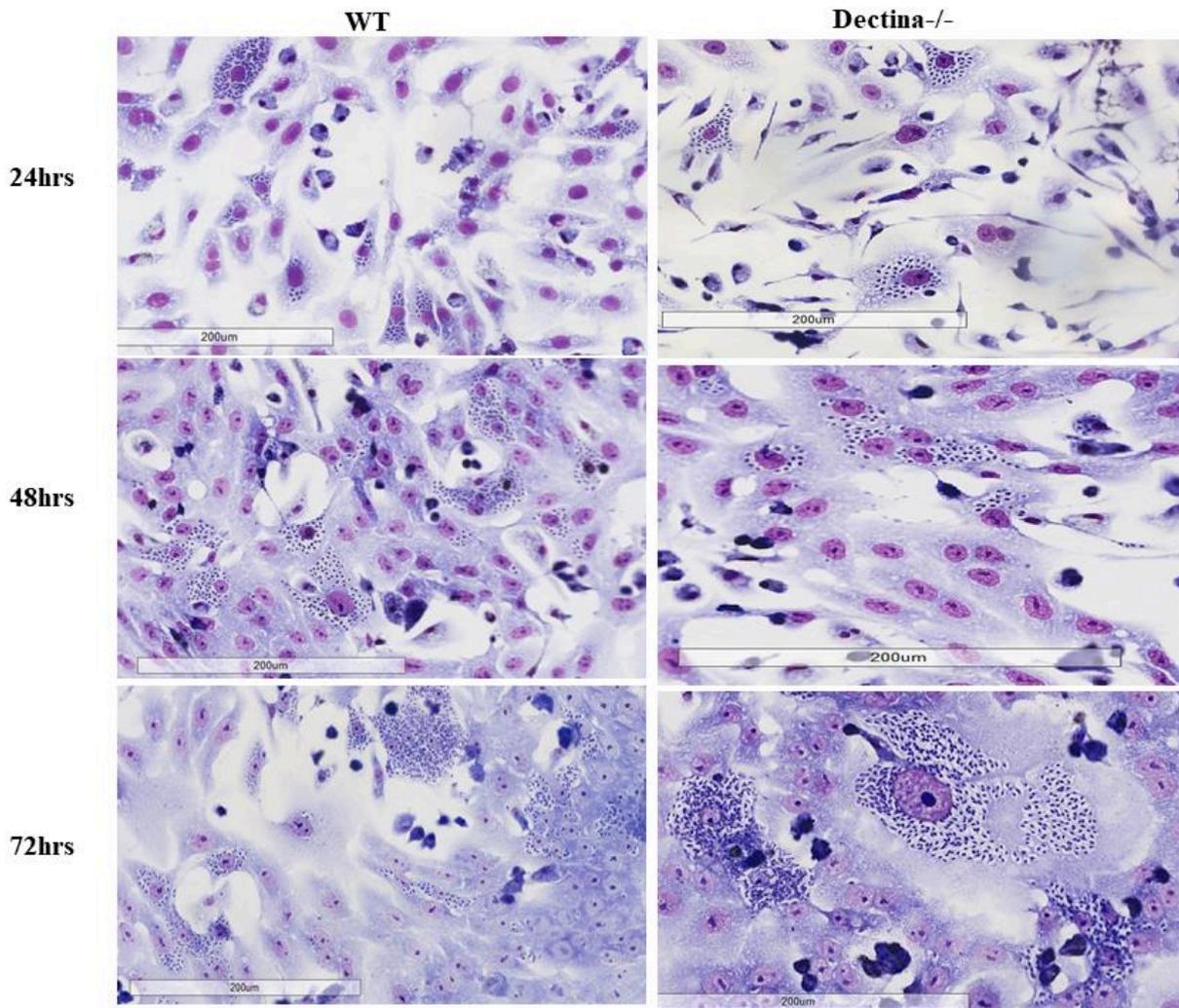
Posteriormente, realizamos o ensaio de multiplicação de amastigotas intracelulares. Nesse ensaio, infectamos os macrófagos WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> e após 24, 48 e 72 horas contamos os amastigotas intracelulares e vimos se a ausência do receptor influenciaria esse processo tardiamente. Conforme podemos observar na **Figura 19**, em 24 horas não houve diferença entre

os grupos analisados, porém após 48 horas de invasão observamos um estacionamento da quantidade de amastigotas nos macrófagos *knockouts* que permanece em multiplicação lenta até 72 horas de infecção, ao contrário do observado em macrófagos WT a qual o número de amastigotas aumenta exponencialmente, como esperado nesse processo, uma vez que envolve a replicação intracelular de parasitas.



**Figura 19. A multiplicação de amastigotas de *T. cruzi* fica prejudicada a partir de 48 horas de infecção.** Macrófagos peritoneais WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> foram submetidos ao ensaio de invasão, após a retirada dos parasitas que não invadiram as células, com 24, 48 e 72 horas corados com Giemsa e foram analisados os amastigotas intracelulares. Observamos que a partir de 48 horas houve um estacionamento na replicação dos amastigotas em macrófagos *knockouts* ao contrário da alta replicação observada no grupo controle (WT). Diferenças significativas foram determinadas por 2wayANOVA e teste de múltiplas comparações Sidak.

Realizamos imagens ilustrativas dos macrófagos peritoneais WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> no ensaio de multiplicação para poder observar o fenômeno demonstrado no gráfico anterior em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 horas) (**Figura 20**).



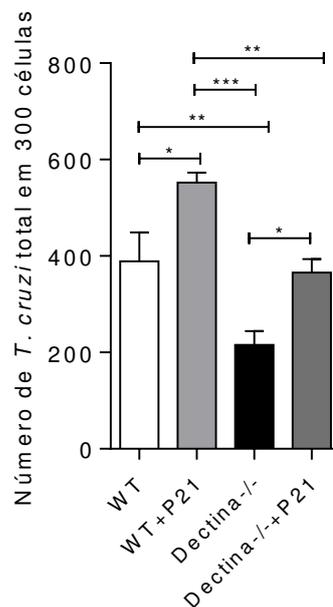
**Figura 20. Amastigotas de *T. cruzi* tem replicação diminuída em macrófagos *Dectina-1*<sup>-/-</sup>.** Imagem representativa de macrófagos peritoneais WT e *Dectina-1*<sup>-/-</sup> infectados por *T. cruzi* e amastigotas analisados com 24, 48 e 72 horas pós infecção e corados com Giemsa. Imagem obtida com scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT- Leica).

Silva e colaboradores (2017), viram que Galectina-3 é uma proteína importante para a regulação negativa do processo de invasão de *T. cruzi*, ou seja, na ausência dessa proteína o parasita invade mais, comparado ao grupo controle. Quando analisado o perfil de multiplicação de amastigotas intracelulares, a ausência da proteína acelera o processo de multiplicação a partir de 72 horas. O perfil de participação dessa proteína, é contrário ao observado por nós em *Dectina-1*, porém segue o mesmo padrão de relação entre a invasão e a multiplicação, em nosso trabalho houve diminuição no processo de invasão e multiplicação a partir de 48 horas, na ausência do receptor. Galectina-3 participa efetivamente como reguladora, enquanto *Dectina-1* auxilia o parasita no seu processo de infecção (invasão e multiplicação).

Após analisar o perfil de influência do receptor Dectina-1<sup>-/-</sup> podemos afirmar que ele contribui positivamente para a progressão da infecção celular causada por *T. cruzi*. A partir desse momento, iniciaremos a busca aos mecanismos envolvidos nesse processo.

### 8.3. rP21 de *T. cruzi* retoma o processo de invasão em macrófagos deficientes para Dectina-1

P21 é conhecida por auxiliar no processo de invasão de *T. cruzi* (RODRIGUES et al., 2012). Uma vez que os macrófagos Dectina-1<sup>-/-</sup> tem o processo de invasão prejudicado quando comparado aos macrófagos WT, investigamos o papel de rP21 nesse processo ao adicionar a proteína ao ensaio de invasão com Giemsa. Observamos, como esperado, que ao adicionar rP21 às células controle (WT) o número de parasitas internalizados aumentou, quando a proteína foi adicionada no grupo *knockout* a quantidade de parasitas se igualou a esperada pelo grupo WT (sem tratamento), sugerindo uma retomada do processo de invasão celular (**Figura 21**).



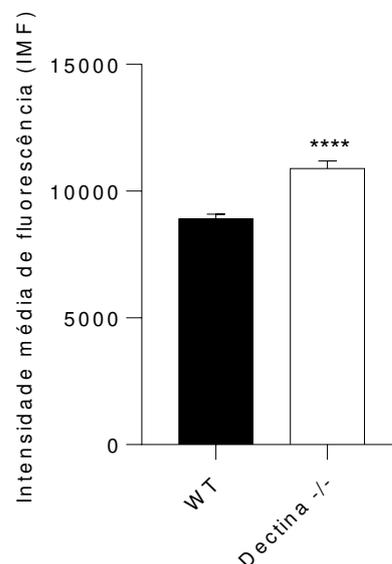
**Figura 21. rP21 retoma o processo de invasão perdido pela ausência de Dectina-1.** Ensaio de invasão realizado com Giemsa, células foram tratadas ou não com 40µg/ml de rP21. Como esperado, ao adicionar a proteína em células WT houve um aumento no número total de parasitas internalizados, quando adicionada ao macrófago Dectina-1<sup>-/-</sup> o número foi aumentado, retomando o número de parasitas internalizados ao mesmo patamar da infecção em macrófagos WT. Diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

Dessa forma, a retomada do processo de invasão estaria acontecendo por algum mecanismo compensatório na falta de Dectina-1. Investigamos se outro receptor não estaria envolvido nesse mecanismo.

#### 8.4. CXCR4 como um mecanismo compensatório da falta de Dectina-1

Estudos do nosso grupo de pesquisa envolvendo a rP21 demonstraram que esta proteína se liga ao receptor CXCR4 e, assim, exerce diversas funções, entre elas a indução de polimerização do citoesqueleto de actina (RODRIGUES et al., 2012, TEIXEIRA et al., 2017). Conhecendo a importância do receptor CXCR4 na infecção por *T. cruzi*, avaliamos o impacto da expressão deste receptor nas células WT e Dectina-1<sup>-/-</sup> não infectadas, para analisar se haveria uma diferença natural.

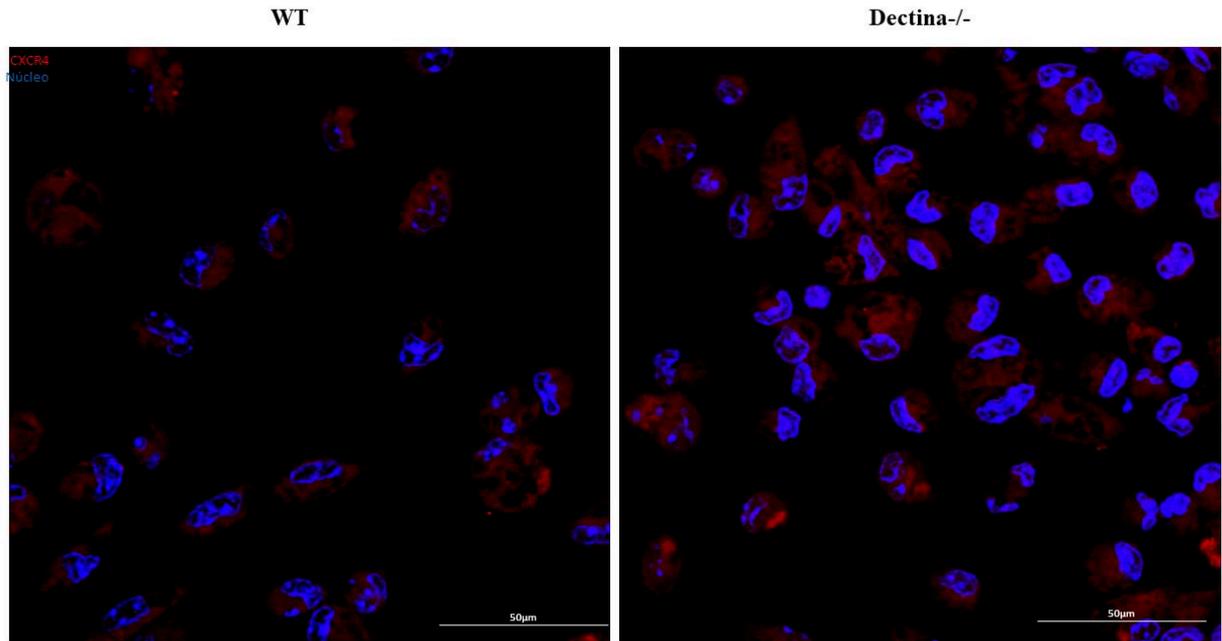
Fizemos ensaio de citometria de fluxo para avaliar a expressão e observamos que as células *knockouts* naturalmente apresentam uma expressão de CXCR4 maior do que as células WT (**Figura 22**). Essa maior expressão atua como um provável mecanismo compensatório da ausência do receptor Dectina-1 e está diretamente ligado com o aumento de *T. cruzi* internalizado em células *knockouts* tratadas com rP21.



**Figura 22. Macrófagos Dectina-1<sup>-/-</sup> apresentam maior expressão de CXCR4.** Após ensaio de citometria de fluxo e marcação de CXCR4, analisamos a expressão do receptor em macrófagos WT e Dectina-1<sup>-/-</sup>. Naturalmente, células sem Dectina-1 apresentaram uma maior expressão de CXCR4 comparada as células controle. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test.

Para complementar a quantificação da expressão de CXCR4 em citometria de fluxo, realizamos o ensaio de imunofluorescência e marcamos CXCR4 mantendo os mesmos

parâmetros de análise de imagens, conseguimos observar que o receptor apresenta uma fluorescência maior em macrófagos *Dectina-1<sup>-/-</sup>* do que em WT (**Figura 23**).



**Figura 23.** A ausência de *Dectina-1* está diretamente relacionada com o aumento da expressão de CXCR4. Ensaio de imunofluorescência marcando CXCR4 em macrófagos peritoneais WT e *Dectina-1<sup>-/-</sup>*. Observamos uma maior fluorescência do receptor em células *knockouts* quando comparadas as células controle. Essa imagem é de representação qualitativa. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). CXCR4: marcação Anti-CXCR4 em vermelho. Núcleo: marcação de TOPRO em azul.

CXCR4 é relevante não apenas para o processo de infecção de *T. cruzi*, mas também para o desenvolvimento de *Plasmodium* sp. nos hepatócitos (BANDO et al., 2019). Além disso, CXCR4 tem um papel importante no HIV, na qual o vírus possui uma proteína que estimula o aumento da expressão desse receptor, contribuindo para a patogênese das comorbidades relacionadas ao HIV (LI et al., 2018). Sendo assim, na ausência de *Dectina-1* as células possuem um mecanismo de compensação, nesse caso o CXCR4. O receptor compensatório precisa da biodisponibilização de rP21 para atuar de forma a restaurar o processo infectivo de *T. cruzi*.

## 9. CONCLUSÃO

Sumarizando, a inibição de Miosina-1 em *T. cruzi* prejudica sua movimentação flagelar, aderência à mioblastos murinos e sinalização dos parasitas (liberação de rP21), dificultando o processo de invasão celular, além de influenciar tardiamente o processo de multiplicação de amastigotas intracelulares. Em células C2C12, também dificulta o processo de invasão pois a ausência de miosina-1 acarreta na deficiência no *delivery* de lisossomos para formação de endossomos e entrada de *T. cruzi* na célula. A superexpressão de CHMP4B também está envolvida no processo de retenção de lisossomos visto que os mesmos irão formar complexos junto aos corpos MVBs que estão sendo formados em maior quantidade e adicionalmente a falta de miosina-1, a invasão do parasita é ainda menor devido a maior dificuldade de transporte intracelular de lisossomos. Quando ambos são inibidos, tanto a miosina-1 do parasita quanto a da célula, o efeito é cumulativo justamente porque os mecanismos de ação da miosina de cada um são diferentes e a invasão é 4x menor. Portanto, miosina-1 tanto do parasita quanto da célula têm um papel fundamental na progressão de infecção por *T. cruzi*. Ainda temos que investigar mais a fundo o papel de P21 e outras proteínas endógenas relacionado a inibição da miosina de *T. cruzi* com o objetivo confirmar a suspeita de que realmente existe uma contenção das mesmas.

Em relação a Dectina-1, o receptor mostrou um importante papel no processo de invasão e multiplicação *in vitro* de *T. cruzi*, auxiliando no processo de progressão da infecção. Vimos que a ausência de Dectina-1 aumenta a expressão de CXCR4 como um mecanismo compensatório natural e, portanto, ao adicionarmos rP21 há uma retomada do processo de invasão. Desse modo, Dectina-1 está participando diretamente do processo de invasão celular e multiplicação por *T. cruzi*. Ainda são necessários estudos complementares para entender o mecanismo celular como um todo, realizaremos ensaios moleculares para identificação das organelas que participam desse evento, como lisossomos e ainda realizaremos ensaios *in vivo*, para entender como é a função sistêmica de Dectina-1 através de parasitemia e análises histológicas e de carga parasitária em órgãos chave da doença de Chagas.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ, J. M.; FONSECA, R.; BORGES DA SILVA, H.; MARINHO, C. R.; BORTOLUCI, K. R.; SARDINHA, L. R.; EPIPHANIO, S.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators Inflamm**, 2014, 912965, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/912965>

ÁLVAREZ-SANTOS, M. D.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, M.; ESTRADA-SOTO, S.; BAZÁN-PERKINS, B. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. **Front Physiol**, 11, 701, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00701>

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

ANDREWS, N. W.; HONG, K. S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, 64, 474–484, 1987. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90062-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90062-2)

ANDREWS, N. W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol Res**, 26, 65–67, 1993.

ANDREWS, N. W. Solving the secretory acid sphingomyelinase puzzle: Insights from lysosome-mediated parasite invasion and plasma membrane repair. **Cell Microbiol**, 21, e13065, 2019. <https://doi.org/10.1111/cmi.13065>

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. Ciclo evolutivo – Hospedeiro invertebrado. **Portal da Doença de Chagas – Fiocruz (ONLINE)**, 2017.

BAIDA, R. C.; SANTOS, M. R.; CARMO, M. S.; YOSHIDA, N.; FERREIRA, D.; FERREIRA, A. T.; EL SAYED, N. M.; ANDERSSON, B.; DA SILVEIRA, J. F. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. **Infect Immun**, 74, 1537–1546, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1537-1546.2006>

BAIETTI, M. F.; ZHANG, Z.; MORTIER, E.; MELCHIOR, A.; DEGEEST, G.; GEERAERTS, A.; IVARSSON, Y.; DEPOORTERE, F.; COOMANS, C.; VERMEIREN, E.; ZIMMERMANN, P.; DAVID, G. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. **Nat Cell Biol**, 14, 677–685, 2012.

<https://doi.org/10.1038/ncb2502>

BANDO, H.; PRADIPTA, A.; IWANAGA, S.; OKAMOTO, T.; OKUZAKI, D.; TANAKA, S.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; LEE, Y.; MA, J. S.; SAKAGUCHI, N.; SOGA, A.; FUKUMOTO, S.; SASAI, M.; MATSUURA, Y.; YUDA, M.; JACOBS-LORENA, M.; YAMAMOTO, M. CXCR4 regulates *Plasmodium* development in mouse and human hepatocytes. **J Exp Med**, 216(8), 1733–1748, 2019.

<https://doi.org/10.1084/jem.20182227>

BATISTA, C. M.; KESSLER, R. L.; EGER, I.; SOARES, M. J. Treatment of *Trypanosoma cruzi* with 2-bromopalmitate alters morphology, endocytosis, differentiation and infectivity. **BMC Cell Biol**, 19, 19, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s12860-018-0170-3>

BATISTA, M. F.; NÁJERA, C. A.; MENEGHELLI, I.; BAHIA, D. The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. **Front Cell Dev Biol**, 8, 396, 2020.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00396>

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis**, 49(5), e52–e54, 2009.

<https://doi.org/10.1086/605091>

BISAGGIO, D. F.; CAMPANATI, L.; PINTO, R. C.; SOUTO-PADRÓN, T. Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. **Acta trop**, 98, 162–175, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.04.003>

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol**, 106, 1349–1358, 1988.

<https://doi.org/10.1083/jcb.106.4.1349>

BORGES, I. P.; CASTANHEIRA, L. E.; BARBOSA, B. F.; DE SOUZA, D. L.; DA SILVA, R. J.; MINEO, J. R.; TUDINI, K. A.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. A.; DE MELO RODRIGUES, V. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, 119, 84–91, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.010>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, 248–254, 1976.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRANDSTAETTER, H.; KISHI-ITAKURA, C.; TUMBARELLO, D. A.; MANSTEIN, D. J.; BUSS, F. Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion. **Autophagy**, 10, 2310–2323, 2014.

<https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984272>

BROWN, G. D.; CROCKER, P. R. Lectin Receptors Expressed on Myeloid Cells. **Microbiol Spectr**, 4, 2016.

<https://doi.org/10.1128/9781555819194.ch25>

BROWN, G. D.; WILLMENT, J. A.; WHITEHEAD, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. **Nat Rev Immunol**, 18, 374–389, 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0004-8>

CAMPO, V. L.; MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CARVALHO, I. *Trypanosoma cruzi* Invasion into Host Cells: A Complex Molecular Targets Interplay. **Mini Rev Med Chem**, 16, 1084–1097, 2016.

<https://doi.org/10.2174/1389557516666160607230238>

CARADONNA, K. L.; BURLEIGH, B. A. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol**, 76, 33–61, 2011.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5>

CARVALHO, T.U. Organização estrutural: Microscopia Óptica - Estudo microscopia óptica, **Portal da Doença de Chagas – Fiocruz (ONLINE)**, 2017.

CARVALHO, T.U.; BARRIAS, E. Mecanismo de Interação: Adesão, reconhecimento, sinalização e invasão. **Portal da Doença de Chagas – Fiocruz (ONLINE)**, 2017.

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um tripanossomo *Trypanosoma cruzi*. **Braz Med**, XIII, 16, 1909.

CHAVES, A. T., DE ASSIS SILVA GOMES ESTANISLAU, J., FIUZA, J. A., CARVALHO, A. T., FERREIRA, K. S., FARES, R. C., GUIMARÃES, P. H., DE SOUZA FAGUNDES, E. M., MORATO, M. J., FUJIWARA, R. T., DA COSTA ROCHA, M. O.;

CORREA-OLIVEIRA, R. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **BMC Infect Dis**, 16, 191, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1523-1>

CHINTHALAPUDI, K.; TAFT, M. H.; MARTIN, R.; HEISLER, S. M.; PRELLER, M.; HARTMANN, F. K.; BRANDSTAETTER, H.; KENDRICK-JONES, J.; TSIIVALIARIS, G.; GUTZEIT, H. O.; FEDOROV, R.; BUSS, F.; KNÖLKER, H. J.; COLUCCIO, L. M.; MANSTEIN, D. J. Mechanism and specificity of pentachloropseudilin-mediated inhibition of myosin motor activity. **J Biol Chem**, 286, 29700–29708, 2011.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.239210>

CORTEZ, C.; SOBREIRA, T. J.; MAEDA, F. Y.; YOSHIDA, N. The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Subcell Biochem**, 74, 137–150, 2014.

[https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_6)

DE BONA, E.; LIDANI, K.; BAVIA, L.; OMIDIAN, Z.; GREMSKI, L. H.; SANDRI, T. L.; DE MESSIAS REASON, I. J. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Front Immunol**, 9, 1842, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>

DORN, P. L.; MELGAR, S.; ROUZIER, V.; GUTIERREZ, A.; COMBE, C.; ROSALES, R.; RODAS, A.; KOTT, S.; SALVIA, D.; MONROY, C. M. The Chagas vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. **J Med Entomol**, 40, 436–440, 2003.

<https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.436>

DRUMMOND, R. A.; DAMBUZA, I. M.; VAUTIER, S.; TAYLOR, J. A.; REID, D. M.; BAIN, C. C.; UNDERHILL, D. M.; MASOPUST, D.; KAPLAN, D. H.; BROWN, G. D. CD4(+) T-cell survival in the GI tract requires dectin-1 during fungal infection. **Mucosal Immunol**, 9, 492–502, 2016.

<https://doi.org/10.1038/mi.2015.79>

FERNANDES, M. C.; FLANNERY, A. R.; ANDREWS, N.; MORTARA, R. A. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cell Microbiol**, 15, 977–991, 2013.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12090>

FINKELSZTEIN, E. J.; DIAZ-SOTO, J. C.; VARGAS-ZAMBRANO, J. C.; SUESCA, E.; GUZMÁN, F.; LÓPEZ, M. C.; THOMAS, M. C.; FORERO-SHELTON, M.; CUELLAR, A.; PUERTA, C. J.; GONZÁLEZ, J. M. Altering the motility of *Trypanosoma cruzi* with rabbit polyclonal anti-peptide antibodies reduces infection to susceptible mammalian cells. **Exp Parasitol**, 150, 36–43, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.007>

FRANCISCO, A. F.; JAYAWARDHANA, S.; OLMO, F.; LEWIS, M. D.; WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Challenges in Chagas Disease Drug Development. **Molecules**, 25, 2799, 2020.

<https://doi.org/10.3390/molecules25122799>

FREITAS, E. C.; OLIVEIRA, M. F.; VASCONCELOS, A. S.; SILVA, J. D.; FILHO, VIANA, C. E.; GOMES, K. C.; CAVALCANTI, L. P. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 50, 44–51, 2017.

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0242-2016>

FRESNO, M.; GIRONES, N. Regulatory Lymphoid and Myeloid Cells Determine the Cardiac Immunopathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Front Microbiol**, 9, 351, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00351>

GONG, Y. N.; GUY, C.; OLAUSON, H.; BECKER, J. U.; YANG, M.; FITZGERALD, P.; LINKERMANN, A.; GREEN, D. R. ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. **Cell**, 169, 286–300.e16, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.020>

GOUR, N.; LAJOIE, S.; SMOLE, U.; WHITE, M.; HU, D.; GODDARD, P.; HUNTSMAN, S.; ENG, C.; MAK, A.; OH, S.; KIM, J. H.; SHARMA, A.; PLANTE, S.; SALEM, I. H.; RESCH, Y.; XIAO, X.; YAO, N.; SINGH, A.; VRTALA, S.; CHAKIR, J.; WILLS-KARP, M. Dysregulated invertebrate tropomyosin-dectin-1 interaction confers susceptibility to allergic diseases. **Sci Immunol**, 3, eaam9841, 2018.

<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9841>

GREENBERG, M. J.; OSTAP, E. M. Regulation and control of myosin-I by the motor and light chain-binding domains. **Trends Cell Biol**, 23, 81–89, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.10.008>

GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, G. K.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; RASSI, A. JR; RASSI, A.; SCHMIDT, A.; MACIEL, B. C.; MARIN NETO, J. A.; SILVA, J. S. 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 Negl Trop Dis**, 6, e1630, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001630>

GUERRERO, N. A.; CAMACHO, M.; VILA, L.; ÍÑIGUEZ, M. A.; CHILLÓN-MARINAS, C.; CUERVO, H.; POVEDA, C.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, e0004025, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004025>

HENNE, W. M.; STENMARK, H.; EMR, S. D. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5, a016766, 2013.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016766>

HORTA, M. F.; ANDRADE, L. O.; MARTINS-DUARTE, É. S.; CASTRO-GOMES, T. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **J Cell Sci**, 133, jcs232488, 2020.

<https://doi.org/10.1242/jcs.232488>

IRETON, K.; VAN NGO, H.; BHALLA, M. Interaction of microbial pathogens with host exocytic pathways. **Cell Microbiol**, 20, e12861, 2018.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12861>

ITO, T.; HIROSE, K.; NORIMOTO, A.; TAMACHI, T.; YOKOTA, M.; SAKU, A.; TAKATORI, H.; SAIJO, S.; IWAKURA, Y.; NAKAJIMA, H. Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite-Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b+ Dendritic Cells. **J Immunol**, 198, 61–70, 2017.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502393>

KAISAR, M.; RITTER, M.; DEL FRESNO, C.; JÓNASDÓTTIR, H. S.; VAN DER HAM, A. J.; PELGROM, L. R.; SCHRAMM, G.; LAYLAND, L. E.; SANCHO, D.; PRAZERES DA COSTA, C.; GIERA, M.; YAZDANBAKHS, M.; EVERTS, B. Dectin-1/2-induced autocrine PGE2 signaling licenses dendritic cells to prime Th2 responses. **PLoS Biol**, 16, e2005504, 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005504>

KAMIYA, T.; TANG, C.; KADOKI, M.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; SAIJO, S.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; IWAKURA, Y.  $\beta$ -Glucans in food modify colonic microflora by inducing antimicrobial protein, calprotectin, in a Dectin-1-induced-IL-17F-dependent manner. **Mucosal Immunol**, 11, 763–773, 2018.

<https://doi.org/10.1038/mi.2017.86>

KATTA, S. S.; TAMMANA, T. V.; SAHASRABUDDHE, A. A.; BAJPAI, V. K.; GUPTA, C. M. Trafficking activity of myosin XXI is required in assembly of *Leishmania* flagellum. **J Cell Sci**, 123, 2035–2044, 2010.

<https://doi.org/10.1242/jcs.064725>

KATOH, K.; SHIBATA, H.; SUZUKI, H.; NARA, A.; ISHIDOH, K.; KOMINAMI, E.; YOSHIMORI, T.; MAKI, M. The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. **J Biol Chem**, 278, 39104–39113, 2003.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M301604200>

KITTELBERGER, N.; BREUNIG, M.; MARTIN, R.; KNÖLKER, H. J.; MIKLAVC, P. The role of myosin 1c and myosin 1b in surfactant exocytosis. **J Cell Sci**, 129, 1685–1696, 2016.

<https://doi.org/10.1242/jcs.181313>

KLESHCHENKO, Y. Y.; MOODY, T. N.; FURTAK, V. A.; OCHIENG, J.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infect immun**, 72(11), 6717–6721, 2004.

<https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6717-6721.2004>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680–685, 1970.

<https://doi.org/10.1038/227680a0>

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J Exp Med**, 168, 649–659, 1988.

<https://doi.org/10.1084/jem.168.2.649>

LI, L. LIM, R.; LEE, L.; CHEW, N. HIV glycoprotein gp120 enhances mesenchymal stem cell migration by upregulating CXCR4 expression. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**, 1862, 1790–1800, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.05.001>

LIMA-JUNIOR, D. S.; MINEO, T.; CALICH, V.; ZAMBONI, D. S. Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. **J Immunol**, 199, 2055–2068, 2017.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700258>

LOW, H. P.; SANTOS, M. A.; WIZEL, B.; TARLETON, R. L. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. **J Immunol**, 160, 1817–1823, 1998.

LUZ, P. R.; MIYAZAKI, M. I.; CHIMINACIO NETO, N.; PADESKI, M. C.; BARROS, A. C.; BOLDT, A. B.; MESSIAS-REASON, I. J. Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, e0004257, 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004257>

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Front Immunol**, 3, 361, 2012.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361>

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J Biol Chem**, 276, 19382–19389, 2001.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M011474200>

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas [Centenary of the discovery of Chagas disease: challenges and prospects]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 43, 483–485, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000500001>

MANNE-GOEHLER, J.; UMEH, C. A.; MONTGOMERY, S. P.; WIRTZ, V. J. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, e0005033, 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005033>

MARTIN, R.; JÄGER, A.; BÖHL, M.; RICHTER, S.; FEDOROV, R.; MANSTEIN, D. J.; GUTZEIT, H. O.; KNÖLKER, H. J. Total synthesis of pentabromo- and pentachloropseudilin, and synthetic analogues--allosteric inhibitors of myosin ATPase. **Angew Chem Int Ed Engl**, 48, 8042–8046, 2009.

<https://doi.org/10.1002/anie.200903743>

MARTINEZ, S. J.; ROMANO, P. S.; ENGMAN, D. M. Precision Health for Chagas Disease: Integrating Parasite and Host Factors to Predict Outcome of Infection and Response to Therapy. **Front Cell Infect Microbiol**, 10, 210, 2020.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00210>

MARTINS, F. A.; DOS SANTOS, M. A.; SANTOS, J. G.; DA SILVA, A. A.; BORGES, B. C.; DA COSTA, M. S.; TAVARES, P.; TEIXEIRA, S. C.; BRÍGIDO, R.; TEIXEIRA, T. L.; RODRIGUES, C. C.; SILVA, N.; DE OLIVEIRA, R. C.; DE FARIA, L. C.; LEMES, M. R.; ZANON, R. G.; TOMIOSSO, T. C.; MACHADO, J. R.; DA SILVA, M. V.; OLIVEIRA, C.; DA SILVA, C. V. The Recombinant Form of *Trypanosoma cruzi* P21 Controls Infection by Modulating Host Immune Response. **Front Immunol**, 11, 1010, 2020.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01010>

MCCULLOUGH, J.; COLF, L. A.; SUNDQUIST, W. I. Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. **Annu Rev Biochem**, 82, 663–692, 2013.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-101058>

MELO, R.; GUARNERI, A. A.; SILBER, A. M. The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. **Front Cell Infect Microbiol**, 10, 27, 2020.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00027>

MILLS, R. M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. **Am J Med**, S0002-9343(20)30520-9, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações técnicas sobre doença de chagas. **Portal do Ministério da Saúde (ONLINE)**, 2019a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. **Saúde de A a Z – Doença de Chagas**, 2019b.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, 17–30, 2009.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005>

MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol**, 36, 404–405, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>

MOTTA, F. N.; AZEVEDO, C.; NEVES, B. P.; ARAÚJO, C. N.; GRELLIER, P.; SANTANA, J. M.; BASTOS, I. Oligopeptidase B, a missing enzyme in mammals and a potential drug target for trypanosomatid diseases. **Biochimie**, 167, 207–216, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.006>

NDE, P. N.; LIMA, M. F.; JOHNSON, C. A.; PRATAP, S.; VILLALTA, F. Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. **Front Immunol**, 3, 337, 2012.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00337>

NGUYEN, T.; WASEEM, M. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). In StatPearls. **StatPearls Publishing**, 2020.

ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. **Genome Biol**, 8, R196, 2007.

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r196>

ONOFRE, T. S.; RODRIGUES, J.; YOSHIDA, N. Depletion of Host Cell Focal Adhesion Kinase Increases the Susceptibility to Invasion by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms. **Front Cell Infect Microbiol**, 9, 231, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00231>

PINAZO, M. J.; ESPINOSA, G.; CORTES-LLETGET, C.; POSADA, E.; ALDASORO, E.; OLIVEIRA, I.; MUÑOZ, J.; GÁLLEGO, M.; GASCON, J. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, e1965, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001965>

RAMIREZ-BARRIOS, R.; SUSAN, E. K.; SMONIEWSKI, C. M.; FAACKS, S. P.; LIGGETT, C. K.; ZIMMER, S. L. A link between mitochondrial gene expression and life stage morphologies in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Microbiol**, 113, 1003–1021, 2020.

<https://doi.org/10.1111/mmi.14466>

RAMIREZ-TOLOZA, G.; FERREIRA, A. *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. **Front Microbiol**, 8, 1667, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, 1388–1402, 2010.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T. M.; DOS SANTOS, M. A.; MACHADO, F. C.; GOMES, R. G.; MOREIRA, H. H.; CRUZ, M. C.; BRÍGIDO, P. C.; DOS SANTOS, P. C.; MARTINS, F. A.; BAHIA, D.; MARICATO, J. T.; JANINI, L. M.; REBOREDO, E. H.; MORTARA, R. A.; DA SILVA, C. V. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. **PloS one**, 7(12), e51384, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

RODRIGUES, J.; SANT'ANA, G.; JULIANO, M. A.; YOSHIDA, N. Inhibition of Host Cell Lysosome Spreading by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Stage-Specific Surface Molecule gp90 Downregulates Parasite Invasion. **Infect Immun**, 85, e00302-17, 2017.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00302-17>

RODRIGUES, J.; SOUZA ONOFRE, T.; BARBOSA, B. C.; FERREIRA, É. R.; BONFIM-MELO, A.; YOSHIDA, N. Host cell protein LAMP-2 is the receptor for *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 that mediates invasion. **Cellular Microbiol**, 21, e13003, 2019.

<https://doi.org/10.1111/cmi.13003>

RODRIGUEZ, A.; WEBSTER, P.; ORTEGO, J.; ANDREWS, N. W. Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. **J Cell Biol**, 137, 93–104, 1997.

<https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.93>

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, 99, 103–107, 2006.

<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

SALES JUNIOR, P. A.; MOLINA, I.; FONSECA MURTA, S. M.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; SALVADOR, F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **Am J Trop Med Hyg**, 97, 1289–1303, 2017.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>

SAN FRANCISCO, J.; BARRÍA, I.; GUTIÉRREZ, B.; NEIRA, I.; MUÑOZ, C.; SAGUA, H.; ARAYA, J. E.; ANDRADE, J. C.; ZAILBERGER, A.; CATALÁN, A.; REMONSELLEZ, F.; VEGA, J. L.; GONZÁLEZ, J. Decreased cruzipain and gp85/transsialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes Infect**, 19, 55–61, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>

SANOJA, C.; CARBAJOSA, S.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **PloS one**, 8, e65820, 2013.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065820>

SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P.; LEVY, A. M.; KAWASSE, L. M.; ZUCOLOTO, S.; DO PRADO, J. C. JR. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. **Acta trop**, 102, 143–150, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.04.010>

SANTOS, F. M.; BARRETO, W.; DE MACEDO, G. C.; BARROS, J.; XAVIER, S.; GARCIA, C. M.; MOURÃO, G.; DE OLIVEIRA, J.; RIMOLDI, A. R.; PORFÍRIO, G.; DE ANDRADE, G. B.; PERLES, L.; ANDRÉ, M. R.; JANSEN, A. M.; HERRERA, H. M. The reservoir system for *Trypanosoma* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) species in large neotropical wetland. **Acta trop**, 199, 105098, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105098>

SANTOS, M. A.; TEIXEIRA, F. B.; MOREIRA, H. H.; RODRIGUES, A. A.; MACHADO, F. C.; CLEMENTE, T. M.; BRIGIDO, P. C.; SILVA, R. T.; PURCINO, C.; GOMES, R. G.; BAHIA, D.; MORTARA, R. A.; MUNTE, C. E.; HORJALES, E.; DA SILVA, C. V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep**, 4, 4259, 2014.  
<https://doi.org/10.1038/srep04259>

SASS, G.; MILLER CONRAD, L. C.; NGUYEN, T. H.; STEVENS, D. A. The *Pseudomonas aeruginosa* product pyochelin interferes with *Trypanosoma cruzi* infection and multiplication in vitro. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 114, 492–498, 2020.  
<https://doi.org/10.1093/trstmh/trz136>

SASS, G.; TSAMO, A. T.; CHOUNDA, G.; NANGMO, P. K.; SAYED, N.; BOZZI, A.; WU, J. C.; NKENGFAK, A. E.; STEVENS, D. A. Vismione B Interferes with *Trypanosoma cruzi* Infection of Vero Cells and Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Am J Trop Med Hyg**, 101, 1359–1368, 2019.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; ELÓI-SANTOS, S. M.; GONTIJO, E. D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **BMC Infect Dis**, 12, 123, 2012.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-123>

SCHAEFER, A. W.; COSCARÓN, M. C. The status of *Linshcosteus* in the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **J Med Entomol**, 38, 862–867, 2001.  
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.6.862>

SCHARFSTEIN, J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system: lessons from survival strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Hematol**, 25, 347–357, 2018.  
<https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000444>

SCHLIWA, M.; WOEHLKE, G. Molecular motors. **Nature**, 422, 759–765, 2003.  
<https://doi.org/10.1038/nature01601>

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim epidemiológico – Ministério da Saúde**, 50, 2019.

SILVA, A. A.; TEIXEIRA, T. L.; TEIXEIRA, S. C.; MACHADO, F. C.; DOS SANTOS, M. A.; TOMIOSSO, T. C.; TAVARES, P.; BRÍGIDO, R.; MARTINS, F. A.; SILVA, N.; RODRIGUES, C. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MORTARA, R. A.; LOPES, D. S.; ÁVILA, V.; DA SILVA, C. V. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. **Front Cell Infect Microbiol**, 7, 463, 2017.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00463>

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

SILVA, M. V.; FERREIRA FRANÇA, F. B.; MOTA, C. M.; DE MACEDO JÚNIOR, A. G.; RAMOS, E. L.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Dectin-1 Compromises Innate Responses and Host Resistance against *Neospora caninum* Infection. **Front Immunol**, 8, 245, 2017.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00245>

SOUZA, D.; PAVONI, D. P.; KRIEGER, M. A.; LUDWIG, A. Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization. **Sci Rep**, 8, 1376, 2018.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18865-y>

SOUZA, W.; VIDAL, J. Organização estrutural: Estudo por microscopia eletrônica de transmissão. **Portal da Doença de Chagas – Fiocruz (ONLINE)**, 2017a.

SOUZA, S.; VIDAL, J. Taxonomia Morfológica - Métodos Morfológicos. **Portal da Doença de Chagas, Fiocruz (ONLINE)**, 2017b.

SPITZNAGEL, D.; O'ROURKE, J. F.; LEDDY, N.; HANRAHAN, O.; NOLAN, D. P. Identification and characterization of an unusual class I myosin involved in vesicle traffic in *Trypanosoma brucei*. **PloS one**, 5, e12282, 2010.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012282>

STECCONI-SILVA, R. B.; ANDREOLI, W. K.; MORTARA, R. A. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98, 953–958, 2003.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700016>

STORER, T.I.; USINGER, R.L. Zoologia Geral. **São Paulo: Companhia Editora Nacional**, 2ª ed, 2005.

TAKAGAWA, T.; KITANI, A.; FUSS, I.; LEVINE, B.; BRANT, S. R.; PETER, I.; TAJIMA, M.; NAKAMURA, S.; STROBER, W. An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances Dectin-1-induced immunity in a mouse model of colitis. **Sci Transl Med**, 10, ean8162, 2018.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8162>

TEIXEIRA, S. C.; LOPES, D. S.; GIMENES, S. N.; TEIXEIRA, T. L.; DA SILVA, M. S.; BRÍGIDO, R. T.; DA LUZ, F. A.; DA SILVA, A. A.; SILVA, M. A.; FLORENTINO, P. V.; TAVARES, P. C.; DOS SANTOS, M. A.; ÁVILA, V. M.; SILVA, M. J.; ELIAS, M. C.; MORTARA, R. A.; DA SILVA, C. V. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Sci rep**, 7, 44978, 2017.  
<https://doi.org/10.1038/srep44978>

TEIXEIRA, S. C.; SILVA LOPES, D.; SANTOS DA SILVA, M.; CORDERO DA LUZ, F. A.; CIRILO GIMENES, S. N.; BORGES, B. C.; ALVES DA SILVA, A.; ALVES MARTINS, F.; ALVES DOS SANTOS, M.; TEIXEIRA, T. L.; OLIVEIRA, R. A.; DE MELO RODRIGUES ÁVILA, V.; BARBOSA SILVA, M. J.; ELIAS, M. C.; MARTIN, R.; VIEIRA DA SILVA, C.; KNÖLKER, H. J. Pentachloropseudilin Impairs Angiogenesis by Disrupting the Actin Cytoskeleton, Integrin Trafficking and the Cell Cycle. **ChemBiochem**, 20, 2390–2401, 2019.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201900203>

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

<https://doi.org/10.1038/srep16877>

TONE, K.; STAPPERS, M.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors of the Dectin-1 cluster: Physiological roles and involvement in disease. **Eur J Immunol**, 49, 2127–2133, 2019.

<https://doi.org/10.1002/eji.201847536>

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, 31, 472–481, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)

URAY, K.; MAJOR, E.; LONTAY, B. MicroRNA Regulatory Pathways in the Control of the Actin-Myosin Cytoskeleton. **Cells**, 9, 1649, 2020.

<https://doi.org/10.3390/cells9071649>

VIEIRA, J. L.; TÁVORA, F.; SOBRAL, M.; VASCONCELOS, G. G.; ALMEIDA, G.; FERNANDES, J. R.; DA ESCÓSSIA MARINHO, L. L.; DE MENDONÇA TROMPIERI, D. F.; DE SOUZA NETO, J. D.; MEJIA, J. Chagas Cardiomyopathy in Latin America Review. **Curr Cardiol Rep**, 21, 8, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s11886-019-1095-y>

VIEIRA, M.; DUTRA, J. M.; CARVALHO, T. M.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochem Cell Biol**, 118, 491–500, 2002.

<https://doi.org/10.1007/s00418-002-0477-0>

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 7, 157–163, 2009.

<https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>

VOTÝPKA, J.; D'AVILA-LEVY, C. M.; GRELLIER, P.; MASLOV, D. A.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends Parasitol**, 31, 460–469, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015>

WANG, K.; WLOKA, C.; BI, E. Non-muscle Myosin-II Is Required for the Generation of a Constriction Site for Subsequent Abscission. **iScience**, 13, 69–81, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.010>

WHO. The Weekly Epidemiological Record (WER). **Weekly epidemiological record**, 90, 33–44, 2015.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization: Health Topics**, 2020.

WOODMAN, P. ESCRT-III on endosomes: new functions, new activation pathway. **Biochem J**, 473, e5–e8, 2016.

<https://doi.org/10.1042/BJ20151115>

WOOLNER, S.; BEMENT, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. **Trends Cell Biol**, 19(6), 245–252, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.03.003>

WOOLSEY, A. M.; BURLEIGH, B. A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cell Microbiol**, 6, 829–838, 2004.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x>

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell Biochem**, 47, 82–91, 2008.

[https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_6)

ZHAO, P.; LI, C.; CHEN, B.; SUN, G.; CHAO, H.; TU, Y.; BAO, Z.; FAN, L.; DU, X.; JI, J. Up-regulation of CHMP4B alleviates microglial necroptosis induced by traumatic brain injury. **J Cell Mol Med**, 24, 8466–8479, 2020.

<https://doi.org/10.1111/jcmm.15406>

ZHAO, Y.; CHU, X.; CHEN, J.; WANG, Y.; GAO, S.; JIANG, Y.; ZHU, X.; TAN, G.; ZHAO, W.; YI, H.; XU, H.; MA, X.; LU, Y.; YI, Q.; WANG, S. Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumour immunity through the induction of Th9 cells. **Nat Commun**, 7, 12368, 2016.

<https://doi.org/10.1038/ncomms12368>

**ANEXO I**



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "O papel do receptor Dectina-1 na infecção por *Trypanosoma cruzi*", protocolo nº 003/18, sob a responsabilidade de Claudio Vieira da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **23 de Março de 2018**.

(We certify that the project entitled "O papel do receptor Dectina-1 na infecção por *Trypanosoma cruzi*", protocol 003/18, under the responsibility of Claudio Vieira da Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 23th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 07/05/2018 Término: 05/12/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i> - Camundongo
Número de animais	108
Peso / Idade	6 semanas / 20 gramas
Sexo	Variável
Origem / Local	CBEA
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 17 de abril de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFU