

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ISABELLA TEIXEIRA MARQUES

**Envolvimento do receptor Dectina-1 e da proteína recombinante P21 na infecção experimental por
*Trypanosoma cruzi***

Uberlândia
2021

Isabella Teixeira Marques

**Envolvimento do receptor Dectina-1 e da proteína recombinante P21 na infecção experimental por
*Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado
à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das
exigências para a obtenção do
título de licenciada e bacharelada
em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva
Co-orientadora: Dr. Mylla Spirandelli da Costa.

Isabella Teixeira Marques

Envolvimento do receptor Dectina-1 e da proteína recombinante P21 na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal de Uberlândia,
como exigência para obtenção ao título
de licenciado e bacharelado em
Ciências Biológicas

Uberlândia, 18 de Outubro de 2021.

Banca examinadora:
Dra. Aline Alves da
Silva
Dr. Murilo Vieira da Silva

UBERLÂNDIA

2021

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e á Nossa Senhora por terem me guiado, protegido e dado forças durante toda a minha trajetória na graduação.

Aos meus amados pais, Rosa e Leandro, por terem apoiado meus estudos desde nova, pelos sacrifícios e dificuldades que passaram, além de acreditarem no meu potencial e me incentivarem a não desistir. Sem eles, eu não teria conseguido chegar até aqui.

À toda minha família, minha prima/irmã Maria Clara, meu avô Otacílio, que segurava minha mão quando eu chorava, meus tios Bruno e José Roberto que estiveram comigo em todos os momentos dando suporte emocional e acolhimento, minha tia Isabel, mesmo espiritualmente, sempre me deu forças para eu realizar meu sonho e não desistir e a todos que de alguma forma me ajudaram a conquistar meus objetivos.

Ao meu orientador, Cláudio Vieira da Silva, por ter me aceitado com tanto carinho e atenção. Sempre foi muito disposto e me proporcionou aprendizados e experiências incríveis.

À minha coorientadora Mylla que também se tornou uma grande amiga. Me ajudou em todos os momentos e foi uma ótima companheira de trabalho, além de me ensinar tudo com muita paciência.

Aos membros do Laboratório de Tripanossomatídeos da UFU por todos os aprendizados e convivência.

Aos meus amigos e amigas, Rayane, Hellen, Maria Thereza, Ana Karolina, Glauber, César, Carolina, Alexia, Taynara, Rafaela, Juliene, Milena por todo apoio e companheirismo durante toda graduação.

Á Universidade Federal de Uberlândia, que permitiu minha formação graças a toda estrutura e suporte.

Por fim, agradeço imensamente a Dra. Aline e o Dr. Murilo por terem aceitado o gentilmente o convite para compor a banca.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado, agente etiológico da doença de Chagas e possui três formas de vida: epimastigota, amastigota e tripomastigota. O parasito expressa moléculas distintas em sua superfície, as quais interagem com componentes das células hospedeiras durante o processo de invasão celular que pode ser dividido em três estágios: adesão-reconhecimento, sinalização e invasão. *T. cruzi*, portanto, é capaz de invadir (ativa ou passivamente) e replicar-se no interior de uma grande variedade de células nucleadas, inclusive macrófagos. P21 é uma proteína de 21 kDa expressada e secretada por todas as formas de *T. cruzi* envolvidas na invasão de células fagocíticas e não fagocíticas. Possui uma forma recombinante (rP21), caracterizada por aderir à superfície das células alvo. Além disso, quando se utiliza anticorpos policlonais que vão se ligar à rP21, há inibição do processo de invasão celular pelas formas amastigotase tripomastigotas metacíclicos *in vitro*. Dectina-1 é um receptor que reconhece β - glucanos e já foi demonstrado apresentando um papel complexo nas mais distintas infecções fúngicas, bacterianas e por protozoários, mas ainda não existe na literatura a influência desse receptor durante a infecção por *T. cruzi*. O objetivo do trabalho foi analisar o efeito do receptor Dectina-1 da proteína P21 durante o processo de infecção pelo parasito tratado com rP21. Observamos que a ausência desse receptor leva a uma diminuição no número de parasitas internalizados pelos macrófagos após 2 horas de invasão e que a multiplicação desses parasitas dentro dessas células após 48 e 72 horas é também reduzida. Quando a rP21 está presente, há um estímulo no processo de invasão dos parasitas internalizados nos macrófagos, porém no coração há uma grande diminuição da inflamação ali presente. Portanto, Dectina-1 tem um importante papel para *T. cruzi* na progressão da Doenças de Chagas quando associada a rP21.

Palavras chave: *T. cruzi*, Dectina-1, P21, invasão celular, Doença de Chagas e infecção.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan, etiological agent of Chagas disease, and has three life forms: epimastigote, amastigote and trypomastigote. The parasite expresses distinct molecules on its surface, which interact with host cell components during the cell invasion process that can be divided into three stages: adhesion-recognition, signaling, and invasion. *T. cruzi*, therefore, is able to invade (actively or passively) and replicate inside a wide variety of nucleated cells, including macrophages. P21 is a 21 kDa protein expressed and secreted for all of *T. cruzi* involved in the invasion of phagocytic and non-phagocytic cells. Dectin-1 is a receptor that recognizes β -glucans and has been shown to play a complex role in the most diverse fungal infections, and protozoa, but the influence of this receptor during *T. cruzi* infection is not reported in the literature. The aim of the work is to analyze the role of the Dectin-1 receptor and P21 protein during the process of infection by the parasite treated with rP21. We observed that the absence of this receptor leads to a decrease in the number of parasites internalized by macrophages after 2 hours of invasion and that the multiplication of these parasites within these cells after 48 and 72 hours is also reduced. In the heart there is a great decrease in the inflammation in the presence of rP21, because there is a stimulus in the invasion process of the internalized parasites in the macrophages. Therefore, Dectin-1 plays an important role for *T. cruzi* in the progression of Chagas Disease when associated with rP21.

Key words: *T. cruzi*, Dectin-1, P21, cell invasion, Chagas disease and infection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
1.1 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	08
1.1.1 CICLO DE VIDA	09
1.1.2 DOENÇA DE CHAGAS	10
1.1.3 P21 E O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	12
2 DECTINA-1.	13
3 METODOLOGIA.....	15
3.1 ANIMAIS	15
3.2 CULTIVO DE CÉLULAS E PARASITAS.....	15
3.3 MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	15
3.4 ENSAIO DE INVASÃO	16
3.4.1 ENSAIO DE MULTIPLICAÇÃO.....	16
3.4.2 COLORAÇÃO DE GUIEMSA.....	16
3.5 PURIFICAÇÃO DA Rp21.....	16
3.6 ENSAIO DE INVASÃO TRATANDO COM rP21.....	17
3.6.1 ENSAIO DE MULTIPLICAÇÃO TRATANDO COM rP21.....	18
3.7 INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	19
3.8 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	20
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Dectina-1 está diretamente envolvida no processo de invasão celular por <i>T. cruzi</i>	20
4.2 O receptor Dectina-1 está associado ao processo de multiplicação intracelular de <i>T. cruzi</i>	22
4.3 rP21 retoma o processo de invasão celular por <i>T. cruzi</i> perdido pela ausência de Dectina-1	25
4.4 Menor parasitismo e menor infiltrado leucocitário encontrado em animais nocautes para Dectina-1.....	27
5 CONCLUSÃO.....	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado, agente etiológico da doença de Chagas, capaz de invadir células e hospedar-se em diversos seres vivos (BRENER, 1973;WHO,2017), foi descoberto em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) e estudos realizados a partir de tecidos mumificados no Chile e Peru registraram a presença da doença em humanos há 9.500 anos (AUFDERHEIDE et al, 2004).

T. cruzi pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae que nesta os protozoários podem ser mono ou biflagelares, os flagelos podem surgir a partir de um orifício chamado bolsa flagelar e outra característica desta família é o cinetoplasto, uma região que concentra o DNA mitocondrial (VOTÝPKA et al., 2015).

No gênero *Trypanosoma* existem diversas espécies causadoras de doenças humanas importantes, como *T. cruzi*, *T. rhodesiense* e *T. Gambiense*. Há uma subdivisão neste gênero, grupos que se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro intermediário e depois atingem as glândulas salivares onde podemos encontrar as formas infectantes que são inoculadas mecanicamente chamados de salivaria; e o grupo de *T. cruzi*, os stercoraria, 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 inseridos os protozoários que possuem um desenvolvimento intracelular, chamadas de formas amastigotas. Essas formas se multiplicam no interior de células hospedeiras e estão envolvidas no processo replicativo do parasita (SOUZA; VIDAL, 2017a; SANTOS et al., 2019). Portanto, *T. cruzi* consegue além de sobreviver, se multiplicar dentro das células hospedeiras de mamíferos (BATISTA et al., 2020; RAMIREZ-BARRIOS et al., 2020).

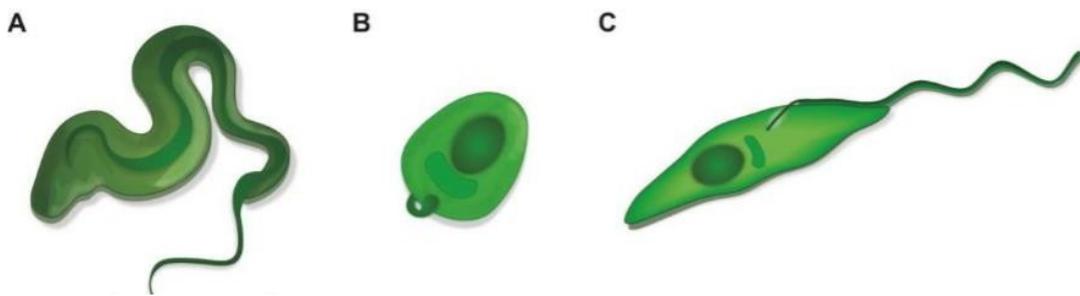


Figura 1. Formas de desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros invertebrados e vertebrados. (A) Tripomastigota, (B) amastigota e (C) epimastigota
Fonte: Figura adaptada de DOS SANTOS, M.A., 2017.

A distribuição geográfica de *T. cruzi* no Brasil é maior na parte norte do país, mais especificamente na região amazônica pois está relacionada com o clima quente e chuvoso, além da ligação com a *Euterpe oleracea*, o açaí, consumido amplamente como suco e polpa pastosa (XAVIER et al., 2014; SANTANA et al., 2019). Além disso, o consumo de carne mal cozida de animais que são reservatórios do parasita, como o tatu (*Dasyppus spp.*), pode levar a transmissão (RUEDA et al., 2014).

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

1.1.1. Ciclo de Vida

T. cruzi infecta seus hospedeiros de diversas maneiras podendo ser transmissão vetorial, congênita, transfusão de sangue, transplante de órgãos e ingestão oral. A transmissão vetorial envolve triatomíneos hematófagos da família Reduviidae, tais como: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistos* ou *Rhodnius prolixus* (COURA, 2015; BORGESPEREIRA, 2010). Seu ciclo de vida (Figura 2) é composto por dois hospedeiros, um mamífero vertebrado e um inseto invertebrado.

Durante o ciclo, o parasita apresenta três formas evolutivas, epimastigotas, tripomastigotas, e amastigota (Figura 1) (SOUZA et al, 2014; DE SOUZA, 1984; TEIXEIRA et al., 2011). O ciclo de vida é um processo complexo, envolvendo mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA,

1984; WALKER et al., 2013). Quando picam um novo vertebrado, os insetos defecam e com isso há a deposição de suas fezes e urina com parasitas sobre a pele do hospedeiro. Quando o indivíduo coça o local, ocorre uma lesão tecidual e partir disso as formas tripomastigotas metacíclicos caem na corrente sanguínea podendo invadir as células e se diferenciar em amastigotas (VIANNA, 1911). Ao final da fase de multiplicação intracelular, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas ainda dentro das células e são liberadas para circularem no espaço extracelular. Estes tripomastigotas, chamados de tripomastigotas sanguíneos, conseguem invadir macrófagos, células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto durante seu repasto sanguíneo.

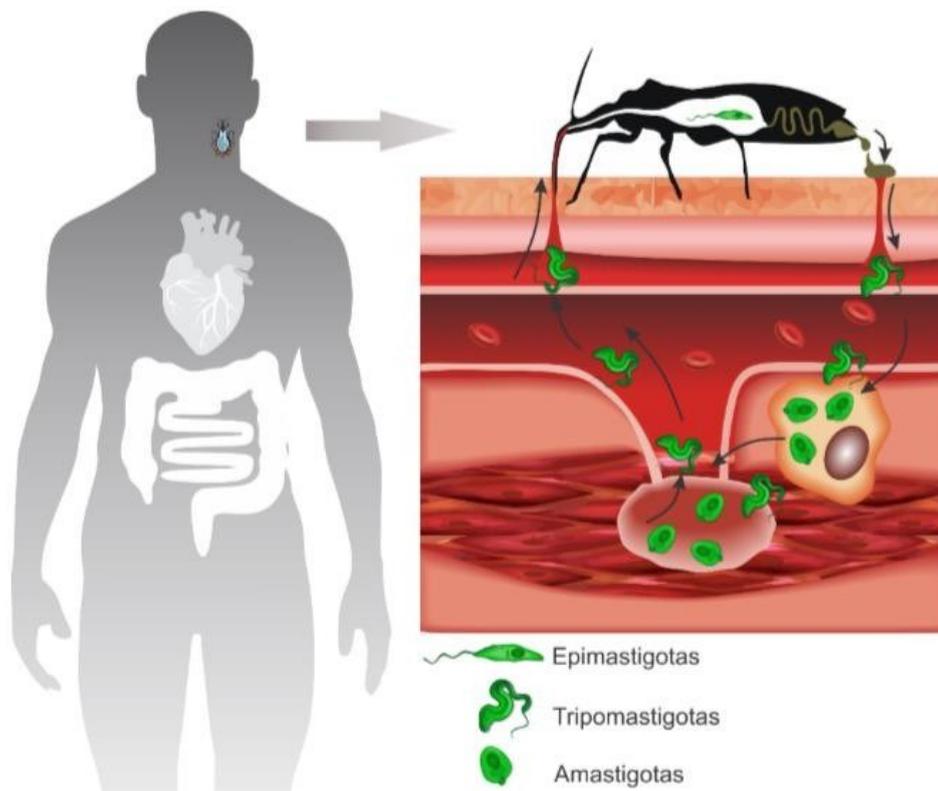


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida *T. cruzi* em hospedeiros invertebrados e vertebrados. Fonte: Figura adaptada de DOS SANTOS, M.A., 2017.

1.1.2 Doença de Chagas

T. cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) e durante anos foi considerada rural. Devido as mudanças socioeconômica e

ao êxodo rural, ela passou a ser considerada uma doença urbana / periurbana (WHO, 2017). Estima-se a existência de 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10000 mortes por ano. No mundo, cerca de 40 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção, constituindo assim um grande problema de saúde pública (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006; WHO, 2017).

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

A doença de Chagas possui duas fases sendo a aguda a que inicia e há um grande número de parasitas circulando no sangue e os sintomas são ausentes ou leves (WHO, 2017) e pode perdurar por cerca de 6 a 8 semanas. Nesta fase, os sintomas podem ser dores no corpo, febre, poliadenia, e mais raramente hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiência cardíaca, podendo assim, serem confundidos com diversas outras infecções (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; ANDRADE, et al., 2011). Por essa razão a Doença de Chagas não é frequentemente diagnosticada neste estágio (WHO, 2017). Neste período da infecção, as formas amastigotas se encontram no interior de fibras cardíacas, células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos e devido a isso uma quantidade de até 30% dos pacientes podem sofrer de distúrbios cardíacos e 10% distúrbios digestivos, em geral apresentam aumento do esôfago ou cólon porém ao longo dos anos a infecção pode levar a morte, muitas vezes súbita, devido a arritmias cardíacas ou insuficiência cardíaca progressiva causada pela destruição do músculo cardíaco e do sistema nervoso (WHO, 2017). Alguns sobreviventes podem permanecer na chamada forma indeterminada por vários anos ou persistir indefinidamente (PEREIRA NUNES, et al., 2013).

A manifestação da forma indeterminada é caracterizada pela positividade de exames sorológicos ou parasitológicos, ausência de sintomas clínicos relevantes, baixa ou nenhuma parasitemia (parasitas ficam ocultos, principalmente no coração, e tubo

digestório) (ANDRADE, et al., 2011; PEREIRA NUNES, et al., 2013). Dessa forma, pessoas infectadas vivendo em áreas endêmicas constituem importantes reservatórios do parasita, podendo transmitir as formas infectantes para insetos vetores e assim disseminar a doença (CUCUNUBÁ, et al., 2016).

O tratamento específico é padrão para todas as modalidades de transmissão e deve ser iniciado o quanto antes. O objetivo do tratamento é curar a infecção, prevenir lesões nos órgãos ou diminuir a evolução das mesmas, e diminuir a possibilidade de transmissão (congenita, transfusão ou transplante) (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). O tratamento da doença de Chagas consiste basicamente na utilização do benzonidazol (Rochagan), o qual a dose varia de acordo com a idade e o peso do paciente porém há reações adversas e as mais frequentes são dermatites, neuropatia, náuseas, vômitos e diarreia (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). A utilização do medicamento é contraindicada para pacientes grávidas ou com deficiência severa nos rins e fígado (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017) e a droga apresenta efeitos mutagênicos e cancerígenos (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006). Assim, a terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz. Diversas drogas têm sido testadas em animais, mas nenhuma consegue suprimir a infecção por *T. cruzi* e promover a cura definitiva em todos os tratados devido à resistência natural apresentada por algumas populações do parasito, devido isso, o estudo de moléculas alvo no próprio hospedeiro como forma de diminuir ou impedir a invasão parasitária, poderia ser uma forma alternativa de alcançar novos métodos terapêuticos viáveis.

1.1.3 P21 e o *Trypanosoma cruzi*

O parasita expressa moléculas distintas em sua superfície, as quais interagem com componentes das células hospedeiras durante a invasão que pode ser dividida em três estágios: adesão-reconhecimento, sinalização e invasão. É importante destacar a capacidade das moléculas secretadas pelo parasita de exercer um papel fundamental nesses processos (DA SILVA et al., 2009; DE SOUZA et al., 2010).

A partir de estudos realizados por Silva et al. (2009) foi identificada e caracterizada uma proteína de 21 kDa (P21), expressada e secretada por todas as formas de *T. cruzi* envolvidas na

invasão de células fagocíticas e não fagocíticas. Possui uma forma recombinante (rP21), caracterizada por aderir à superfície das células alvo. Além disso, quando se utiliza anticorpos policlonais que vão se ligar à rP21, há inibição do processo de invasão celular pelas formas amastigotas e tripomastigotas metacíclicos *in vitro* (SILVA et al., 2009).

Com o intuito de caracterizar outras atividades da rP21, foi realizado por Machado e colaboradores (2014) experimentos adotando um modelo de inflamação crônica em camundongos e de acordo com a metodologia proposta por Bailey et al. (1988) e Grindlay e Waugh (1951), os camundongos receberam, a cada 72h durante nove dias, um tratamento com doses crescentes de rP21 (10µg, 40µg e 100µg). Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e realizadas análises evidenciando que a rP21 está associada com a ativação e recrutamento de células imunes e mastócitos, além de reduzir o número de hemoglobinas sugerindo um papel anti-angiogênico da rP21.

Alguns trabalhos realizados com a rP21 mostraram que esta é uma proteína indutora da fagocitose a partir da ligação com o receptor de quimiocinas chamado CXCR4 e ativa a via da PI3-quinase, local em que se dá a indução da polimerização do citoesqueleto de actina da célula. Nesse mesmo estudo, verificou-se uma grande atividade quimiotática da rP21, *in vitro* e *in vivo*, indicando assim que esta proteína tem um papel importante na evasão do parasita frente à resposta imunológica do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2012). Portanto, a rP21 também poderia ter atividades com outros receptores celulares que poderiam ser alvos a facilitar ou impedir a entrada de *T. cruzi* nas células hospedeiras.

2 DECTINA-1

Dectina-1, também conhecida como CLEC7A (GOODRIDGE et al., 2011) é um receptor de transmembrana do tipo 1C, predominantemente expresso em células mielóides, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (BROWN; CROCKER, 2016).

Foi demonstrado que esse receptor é eficiente na ligação com troponina, *Mycobacterium*, *Leishmania*, galectina e imunoglobulinas galactosiladas. Para que haja a ativação desse receptor dectina-1 deve haver a indução da via de sinalização baseada na fosforilação de tirosina ITAM e ITAM-like, subsequente ativação de CARD9-Bcl10-Malt1 (CBM) através de PKCδ (DRUMMOND et al., 2013) e essa sinalização

regula respostas celulares, como fagocitose, autofagia, produção de lipídeos inflamatórios das células (HARDISON et al., 2012; MA et al., 2014).

Estudos estruturais classificaram Dectina-1 como proteína transmembrana do tipo II formada por um domínio lectina tipo-C (C-terminal) na superfície externa da membrana plasmática (ARIIZUMI et al., 2000)

Dectina-1 está ligada ao reconhecimento de 1,3 β -glucano presente na estrutura de fungos que agridem humanos como por exemplo: *Aspergillus fumigatus* (CHAMILOS et al., 2010), *Candida albicans* (WEVERS et al., 2014), *Candida lusitanae*, *Candida nivariensis* (GRINGHUIS et al., 2011; GRINGHUIS et al., 2012), *Candida parapsilosis* (TOTH et al., 2013), *Fonsecaea monophora* (WEVERS et al., 2014), *Histoplasma capsulatum* (CHAMILOS et al., 2010), e *Aspergillus fumigatus* (GESSNER et al., 2012), *Candida albicans*, *Coccidioides immitis* (VIRIYAKOSOL et al., 2013), *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* (WANG et al., 2014), *Paracoccidioides brasiliensis* (LOURES et al., 2015), *Trichosporon asahii* (HIGASHINOKAMEDA et al., 2015) e com isso fica evidente a importância de Dectina-1 nas infecções fúngicas e explica o porquê muitos grupos tem se dedicado ao estudo desse receptor.

Os alvos de estudo relacionados a Dectina-1 são a sua atuação na atividade imune de alguns protozoários e parasitas de certos grupos. Há alguns anos foi observado que este receptor apresenta um papel importante na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a infecção em experimento com *Leishmania amazonenses*, atuando na ativação de inflamossoma, molécula envolvida com a restrição da replicação deste protozoário (LIMA-JUNIOR et al, 2017).

Outro estudo com protozoários foi feito, e neste caso com o grupo dos Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (SILVA et al, 2017). O estudo mostrou a importância da Dectina-1 para o processo de proliferação desses parasitas, uma vez que camundongos Dectina-1^{-/-} (sem a presença dessa proteína) são mais resistentes a infecção. Porém, ao longo da infecção por *Toxoplasma gondii*, não foi observado nenhuma relação à susceptibilidade, carga parasitária, produção de citocinas em experimentos realizados com outras cepas e vias de infecção em camundongos selvagens e Dectina-1^{-/-}.

Pouco se sabe na literatura sobre a relação entre *T. cruzi* e o receptor Dectina-1. Em função disso, realizamos esse trabalho com o objetivo de explorar possível papel desse receptor na infecção experimental por *T. cruzi*.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes no receptor Dectina-1 – alteração genética no gene *CLEC7A* – (Dectina-1^{-/-}), com idade entre 6-8 semanas. Os camundongos foram mantidos no Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU). Os estudos realizados com camundongos foram previamente aprovados pela Comissão de ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU)(#003/18 - ANEXO I).

3.2 Cultivo de células e parasitas

Células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram utilizadas para manutenção dos parasitas e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). As garrafas de cultura contendo células foram mantidas em estufa de CO₂ (5% de CO₂) à 37 ° C. Este estudo utilizou formas tripomastigotas de cultura de tecidos da cepa Y de *T. cruzi* (TCTY). Para a obtenção dos parasitas, células Vero cultivadas em meio DMEM com 2,5% de SFB, foram infectadas. Após a eclosão, os parasitas foram recolhidos no sobrenadante.

3.3 Macrófagos peritoneais

Para obtenção dos macrófagos peritoneais, tioglicolato 3% foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos WT e Dectina-1^{-/-} com o objetivo de induzir inflamação. Após 72 horas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e uma lavagem peritoneal foi realizada com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (DMEM 10%). Os macrófagos peritoneais coletados foram contados e cultivados em placas para diferentes tipos de ensaios.

3.4 Ensaio de invasão

Em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, macrófagos peritoneais WT e Dectina-1 -/- foram plaqueados em concentração de 1×10^5 células/poço. As células foram incubadas over night e desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (parasita:célula). Após duas horas de incubação, foram fixadas com solução Bouin (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) e então coradas com Giemsa. Para a avaliação da invasão celular realizamos a contagem de 300 células, infectadas ou não e o número de parasitas internalizados nas células infectadas e com isso calculamos a porcentagem de células infectadas.

3.4.1 Ensaio de Multiplicação

Em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, macrófagos peritoneais WT e Dectina-1 -/- foram plaqueados em concentração de 1×10^5 células/poço. As células foram incubadas over night e desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (parasita:célula). Após os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação, foram fixadas com solução Bouin (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) e então coradas com Giemsa. Para avaliar a multiplicação em células Dectina-1 -/- (demais tempos), foi feita a contagem de 100 células infectadas por lamínula e o número de parasitas internalizados em cada uma.

3.4.2 Coloração de Giemsa

Após a fixação com solução Bouin (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas, as células foram lavadas 3X com PBS para remoção completa da solução. Na sequência, as lamínulas com as células foram coradas com Giemsa filtrado e diluído 1/20 por 35 minutos. Por fim, saindo do corante, as células foram desidratadas e clarificadas em solução contendo acetona-xilol em série decrescente de acetona (100% - 30%) e crescente de xilol (30% - 100%) e as lâminas foram montadas.

3.5 Purificação da rP21

A purificação da proteína recombinante P21, foi realizada conforme descrito previamente por SILVA et al., (2009).

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 possuindo o plasmídeo pET-28a(+) (Novagem) que apresenta o gene que codifica a rP21 foram colocadas em meio Luria-Bertani (LB) com o antibiótico de seleção Kanamicina (50 µg/mL) por 18 horas a 37°C e sob agitação. Em seguida, o pré-inóculo foi diluído 1:50 do mesmo meio (LB) e incubado a 37°C, com agitação a 150 RPM. Para estimular a expressão da proteína rP21 foi adicionado 1mM de Isopropyl β-D-1thiogalactopyranoside (IPTG). Após 3 horas de incubação, a solução foi centrifugada 10000 RPM por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em solução de ureia 6M. Na sequência foi acrescentado 10 µL de lisozima a cada 10 mL de material ressuscitado por 20 minutos para que houvesse a lise bacteriana. A seguir, foi utilizado o Sonicador Branson Sonifier 450, por 20 ciclos de um minuto cada com 30 segundos de intervalo entre os ciclos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 20200 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em solução tampão de ureia 6M novamente. A amostra foi incubada com uma resina de níquel over night sob agitação a 4°C.

No dia seguinte, a amostra com a resina foi submetida a três etapas:

(1) três lavagens em tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M);

(2) três lavagens com tampão de lavagem (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, ureia 6M);

(3) quatro eluições com tampão de eluição (imidazol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M). O imidazol tem grande afinidade pelo níquel, compete com a cauda de histidina da rP21 e retira a proteína recombinante.

Após final, o material eluído foi dialisado em PBS com uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/Por 131198) por 48 horas sob agitação contínua a 4°C para retirar a presença de resíduos de ureia e acontecer o renovelamento da proteína.

3.6 Ensaio de invasão tratando com rP21

Com o intuito de avaliar o comportamento do receptor de Dectina- 1 com e sem o tratamento com a rP21 foi realizado um experimento em que macrófagos peritoneais de camundongos WT foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) - grupo 1;

macrófagos peritoneais de camundongos WT foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) em meio de cultura contendo 40µg/ml de rP21 uma vez antes do experimento- grupo 2; macrófagos peritoneais de camundongos Dectina-1-/- foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) - grupo 3; macrófagos peritoneais de camundongos Dectina-1-/- foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) em meio de cultura contendo 40µg/ml de rP21 - grupo 4.

Após o ensaio nos tempos de invasão as lamínulas foram fixadas com solução de Bouin por 15 minutos, coradas com giemsa e em seguida foi realizada a contagem de 300 células, infectadas ou não e o número total de parasitas internalizados nas células infectadas nos quatro grupos.

3.6.1 Ensaio de multiplicação

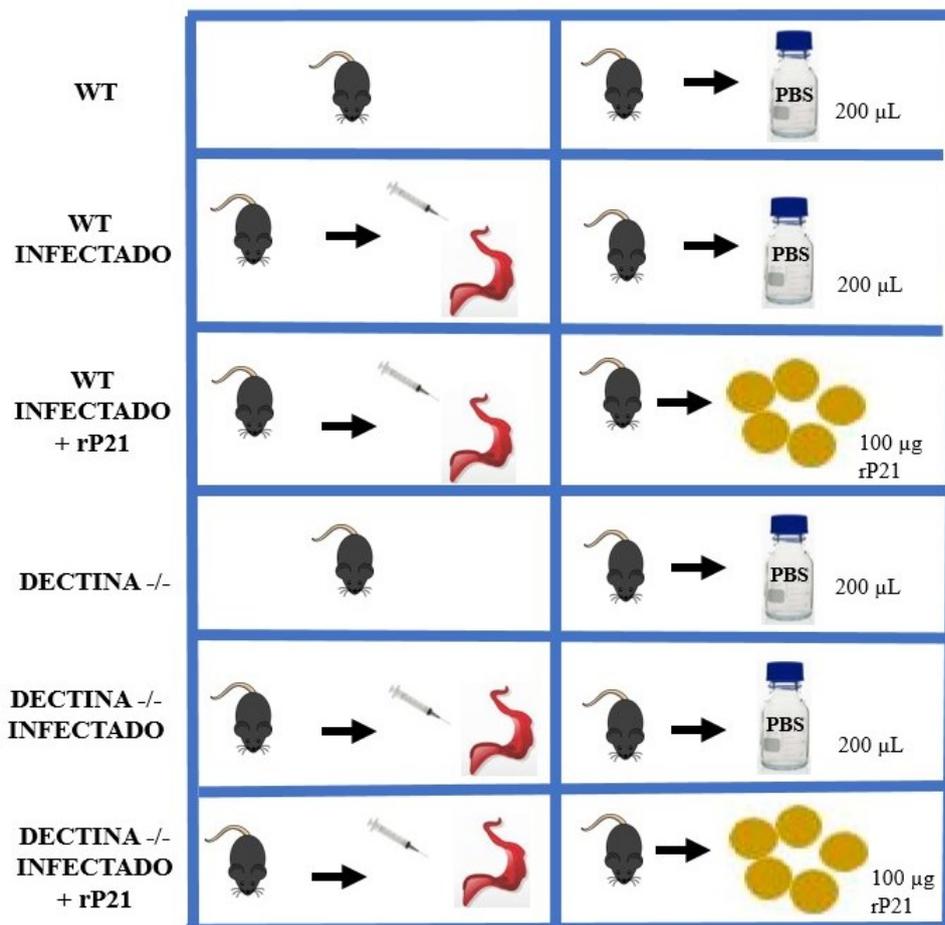
Macrófagos peritoneais de camundongos WT foram plaqueados e parasitas colocados para invadir e multiplicar (10:1) - grupo 1; macrófagos peritoneais de camundongos WT foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) em meio de cultura contendo 40µg/ml de rP21 - grupo 2; macrófagos peritoneais de camundongos Dectina-1-/- foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) - grupo 3; macrófagos peritoneais de camundongos Dectina-1-/- foram plaqueados e parasitas colocados para invadir (10:1) em meio de cultura contendo 40µg/ml de rP21 - grupo 4.

Após o tempo de 96 horas as lamínulas foram fixadas com solução de Bouin por 15 minutos, coradas com giemsa e em seguida foi realizada a contagem de 300 células infectadas e o número de parasitas internalizados em cada uma dessas células.

3.7 Infecção Experimental

Camundongos BALB/c, machos de 6 a 8 semanas de idade, foram aleatoriamente divididos em 6 grupos: Grupo 1 – WT não infectado e tratado com PBS; Grupo 2 – WT infectado com 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* e tratado com PBS; Grupo 3 – WT infectado com 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* e tratado com rP21; Grupo 4 - Dectina^{-/-} não infectado e tratado com PBS; Grupo 5 – Dectina^{-/-} infectado com 10^5 tripomastigotas de *T. cruzi* e tratado com PBS; e Grupo 6 - Dectina^{-/-} infectado com 10^5 tripomastigotas e tratado com rP21.

Os animais foram inoculados na região subcutânea com 10^5 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. O tratamento com PBS ou rP21 foi administrado no mesmo local de infecção no momento da inoculação com o parasita, e repetido a cada dois dias pós-infecção (dpi). O tratamento com rP21 foi realizado na quantidade de 100 μ g por animal, diluída em 200 μ L de PBS 1x. Os grupos que receberam o tratamento com PBS, receberam 200 μ L do tampão fosfato também em região subcutânea No 30^o pós-infecção, os animais foram eutanasiados. O coração dos animais foram coletados para análises histológicas.



3.8 Análises histológicas

Amostras de coração foram fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10% com fosfato de sódio monobásico e dibásico, desidratado em solução de etanol, diafanizado em xilol e embebido em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos de coração foram seccionados em cortes de 5 µm de espessura e colocados sobre lâminas para coloração com hematoxilina-eosina, elas foram scaneadas pelo scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT- Leica) e a partir dessas imagens foi realizada uma busca de presença e ausência de alguns critérios histológicos como: resposta inflamatória, neutrófilos e leucócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, células do plasma, células grandes com corpos estranhos, danos e necroses teciduais, apoptose celular, edema, fibrose, fibroblastos, adipócitos, calcificação do epicárdio e ninho de amastigotas.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a utilização do programa GraphPadPrism 7.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, EUA). E os testes utilizados foram: para comparar diferenças estatísticas entre os ensaios de invasão foi Teste T, sendo os valores de $p < 0,01$ considerados significantes e para o ensaio de multiplicação utilizamos 2way ANOVA, com valores de $p < 0,0001$ considerados significantes. Nos ensaios tanto de invasão, multiplicação e contagem do sobrenadante envolvendo grupos tratados com rP21 as diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dectina-1 está diretamente envolvida no processo de invasão celular por *T. cruzi*.

Inicialmente, com o intuito de entender qual o papel do receptor Dectina-1 durante o processo de invasão por *T. cruzi*, coletamos os macrófagos peritoneais dos camundongos WT e Dectina-1 *-/-* e plaqueamos. Após a adesão celular, os mesmos foram infectados com parasitas por 2hr (Figura 3). Na sequência foi realizada a contagem de

parasitas em 300 células, a quantidade de parasitas em cada célula infectada e a porcentagem de células infectadas.

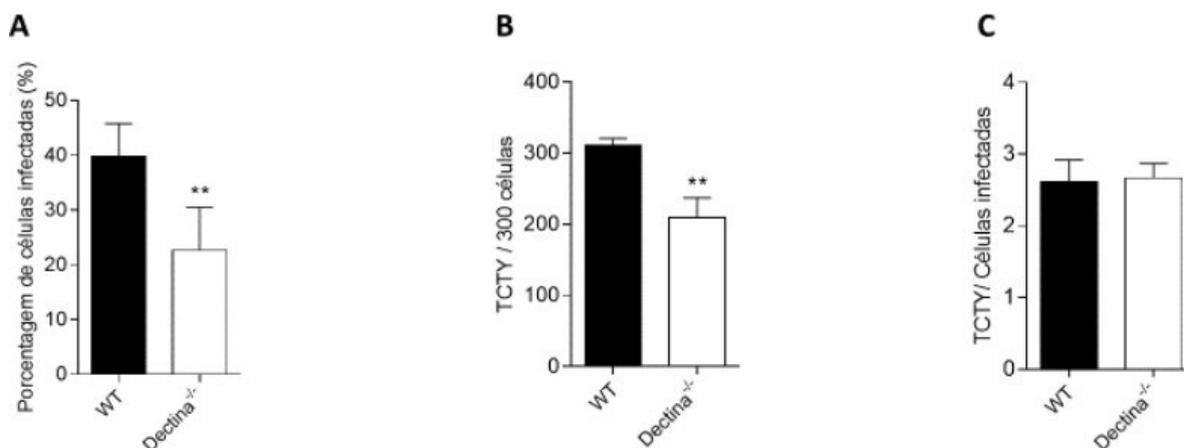


Figura 3. Ensaio de Invasão celular. Macrófagos peritoneais WT e Dectina-1^{-/-} foram plaqueados em concentração de 5×10^4 células/poço. As células foram incubadas overnight e desafiadas com TCTY, na proporção de 10:1 (parasita:célula). Após duas horas de infecção foram fixadas com solução Bouin e coradas com Giemsa. **A** Porcentagem de células infectadas. **B** Quantidade de TCTY em 300 células totais. **C** Razão de TCTY por células infectadas. A diferença estatística foi calculada utilizando o teste T e valores de $p < 0.01$ foram considerados significantes.

Segundo Lima-Junior e colaboradores (2017), a ausência de Dectina-1 aumenta a invasão por *Leishmania amazonensis*, porém é o oposto do que observamos, uma vez que em nossas análises a partir das imagens do ensaio anterior obtidas pelo scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT- Leica) para avaliação quantitativa dos resultados, na ausência do receptor Dectina-1, a porcentagem de células infectadas, assim como o número de parasitas em 300 células, diminui significativamente (Figura 3A e B). Enquanto o número de parasitas por célula infectada permanece o mesmo (Figura 3C). Juntamente com esses dados, Silva e colaboradores (2017) observaram uma redução da infectividade na ausência de Dectina-1 na infecção contra *N. caninum*, parasita que apresenta o mesmo perfil observado em *T. cruzi* evidenciando um papel importante desse receptor no desenvolvimento da infecção por esses dois parasitas intracelulares. Porém este mesmo estudo (Silva et al.; 2017) mostrou que Dectina-1 não influencia no processo infectivo de *T. gondii*, um parasita do mesmo filo do *N. caninum*. Ou seja,

parasitas do mesmo filo e podem apresentar moléculas e desfechos diferentes frente a ausência de um determinado receptor.

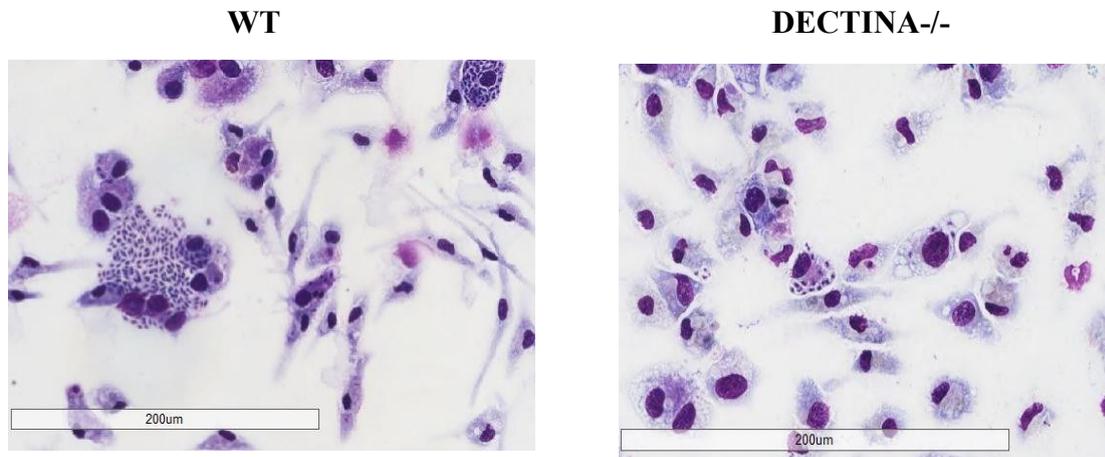


Figura 4. Imagem representativa de macrófagos peritoneais WT e Dectina-1-/- infectados por *T. cruzi*. Imagens obtidas com scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT-Leica) com aumento de 20x.

4.2 O receptor Dectina-1 está associado ao processo de multiplicação intracelular de *T. cruzi*.

No ensaio de multiplicação, para analisarmos a continuidade da infecção a partir da transformação do parasita de tripomastigotas em amastigotas intracelulares e consequente a replicação dos mesmos, deixamos os parasitas replicando por 24hr, 48hr e 72hr (Figura 5). Ao final de cada tempo, fizemos a coloração de Giemsa e contamos o número de amastigotas em 300 células infectadas.

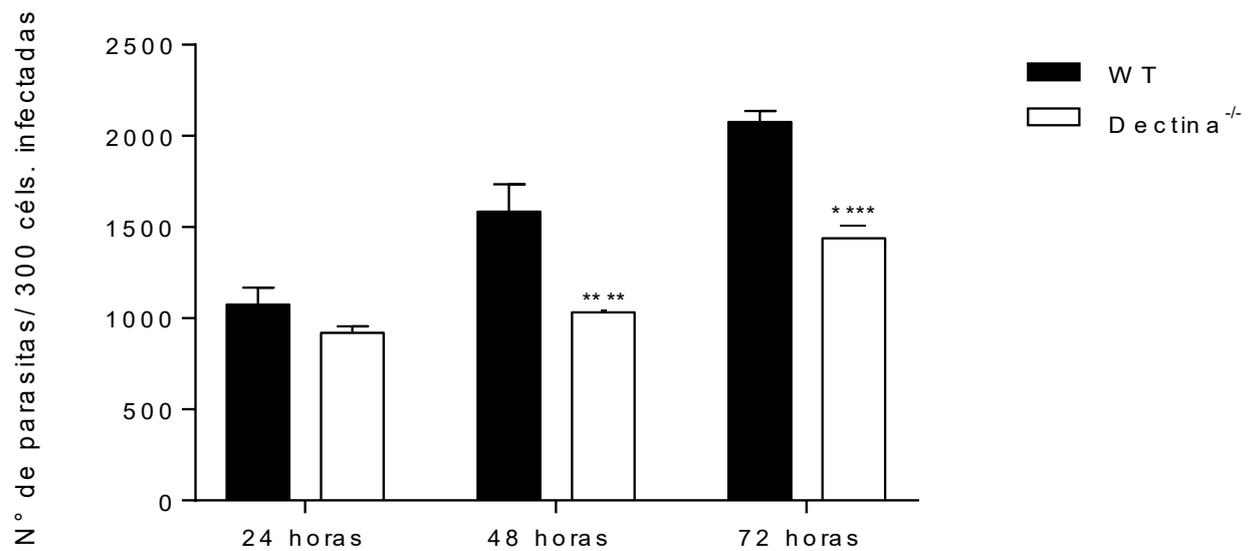


Figura 5. Ensaio de Multiplicação de parasitas. Macrófagos peritoneais WT e Dectin1^{-/-} foram plaqueados 5×10^4 células/poço. As células foram incubadas overnight e desafiadas com TCTY, na proporção de 5:1 (parasita:célula). Após os tempos de invasão de 24, 48 e 72 horas, foram fixadas e coradas com Giemsa. A diferença estatística foi calculada utilizando o teste 2wayANOVA e valores de $p < 0.0001$ foram considerados significantes.

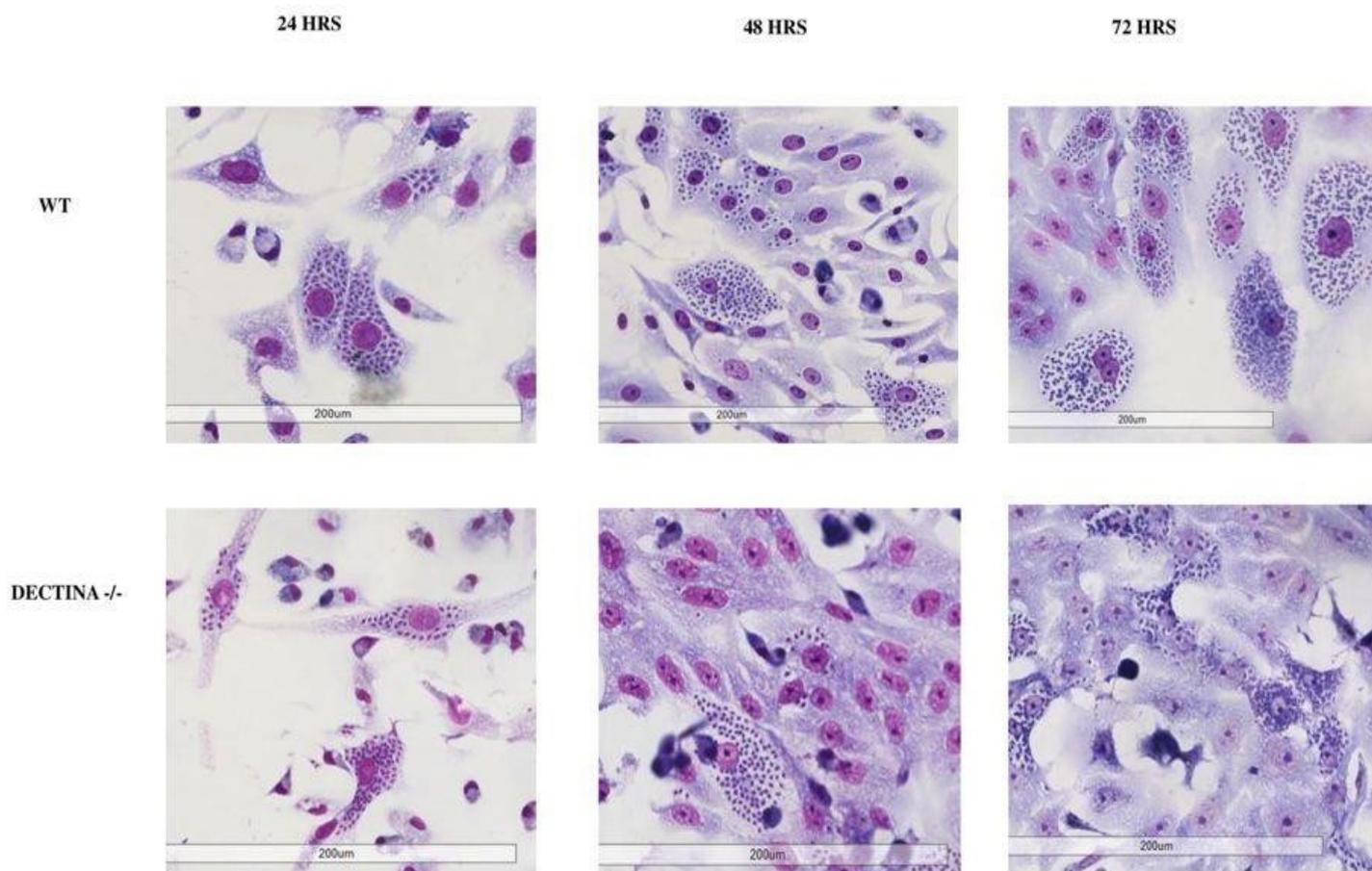


Figura 6. Imagens representativas do ensaio de multiplicação. Imagens obtidas com scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT- Leica) com aumento de 20x.

Com o scanner de lâminas (Aperio Scanscope AT- Leica) obtivemos imagens qualitativas deste experimento de multiplicação evidenciando a diminuição multiplicação dos parasitas a partir do tempo de 48 e 72 horas na ausência do receptor Decina-1. No tempo de 24 horas (Figura 6), a quantidade de amastigotas permaneceu a mesma nas células WT e Dectina-1^{-/-}, porém houve uma diminuição da multiplicação dos parasitas a partir dos tempos de 48hr e 72hr na ausência do receptor Dectina-1 enquanto que nas células WT os parasitas continuavam a se replicar.

Dectina-1 parece auxiliar o parasita *T. cruzi* no seu processo de infecção, tanto na invasão quanto multiplicação. Contudo, Silva e colaboradores (2017) realizaram um trabalho envolvendo Galectina-3, uma proteína da família das lectinas que se liga a carboidratos, e observaram que a deficiência de galectina-3 promovia efeito contrário à deficiência na expressão de dectina-1. De acordo com Costa (2020), galectina-3

participaria do processo de invasão celular como molécula reguladora, enquanto Dectina-1 ajudaria o parasita no seu processo de infecção (invasão e multiplicação) (COSTA 2020).

4.3 rP21 retoma o processo de invasão celular por *T. cruzi* perdido pela ausência de Dectina-1.

O próximo experimento realizado foi o ensaio de invasão onde os macrófagos peritoneais WT e Dectina-1 *-/-* foram plaqueados e tratados ou não com 40µg/ml de rP21 e desafiados com *T. cruzi* por um tempo de 2 horas, com o intuito de analisar o papel dessa proteína secretada por *T. cruzi* e envolvida diretamente na invasão celular por amastigotas e tripomastigotas (MARTINS et al.; 2019). Segundo Teixeira e colaboradores 2016 é possível verificar que a proteína recombinante 21 de *T. cruzi* apresenta importantes atividades biológicas, tais como indução da polimerização do citoesqueleto de actina, recrutamento de células do sistema imunológico além de regular positivamente a invasão dos parasitos em células não fagocíticas (SILVA et al., 2009) e aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos (BORGES, 2019).

As células WT tratadas sofreram um aumento no número total de parasitas internalizados como já esperado, porém nas células Dectina-1 *-/-* tratadas com a proteína o número foi aumentado, retomando o número de parasitas internalizados e o igualando a infecção em macrófagos WT (Figura 7). Isso foi possível observar com a porcentagem de células infectadas (A), no número de *T. cruzi* em 300 células (B) e no número de *T. cruzi* nas células infectadas (C).

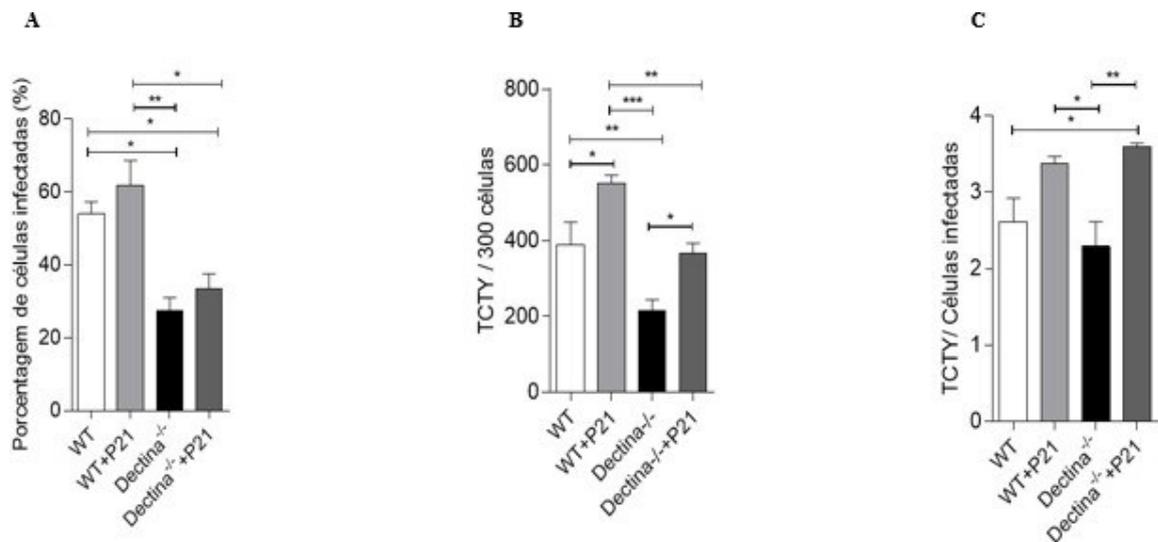


Figura 7. Ensaio de Invasão com células tratadas ou não com 40µg/ml de rP21. Macrófagos peritoneais WT e Dectina-1 ^{-/-} foram plaqueados em concentração de 5x10⁴ células/poço. As células foram incubadas overnight, tratadas ou não com 40µg/ml de rP21 e desafiadas com TCTY, na proporção de 5:1 (parasita:célula). Após duas horas de infecção foram fixadas com solução Bouin e coradas com Giemsa. **A** Porcentagem de células infectadas. **B** Quantidade de TCTY em 300 células. **C** Razão de TCTY por células infectadas. As diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA.

Estudos realizados por Martins e colaboradores(2015) demonstraram que o tratamento de mioblastos com a rP21 resulta em uma diminuição significativa da multiplicação intracelular de *T. cruzi*, em conjunto com o aumento da polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira. Somado a isto realizamos um experimento para analisarmos a presença da rP21 na multiplicação em questão, onde os parasitas se multiplicavam em células tratadas ou não com 40µg/ml de rP21 por 96 horas.

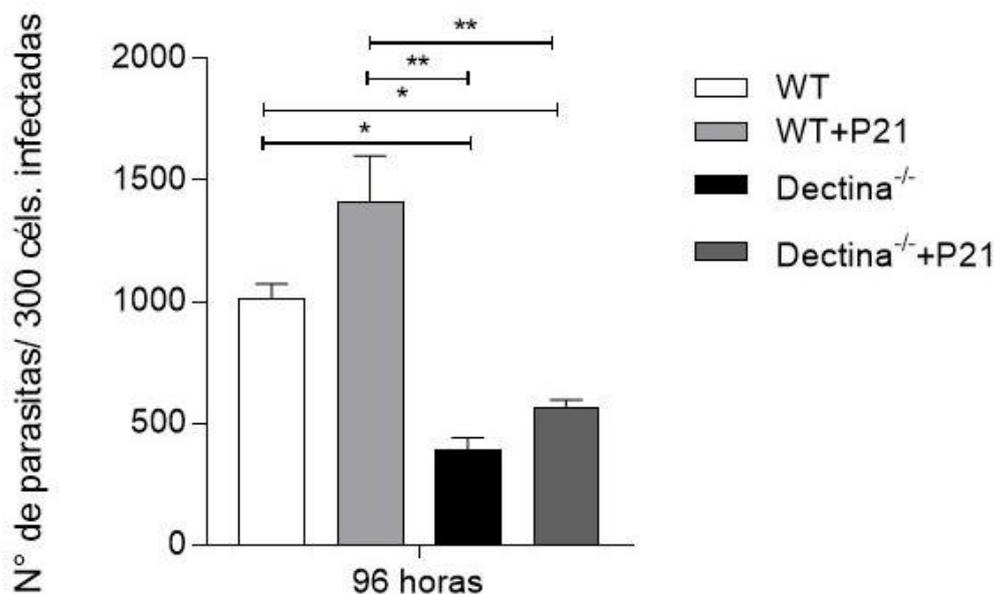


Figura 8. Ensaio de Multiplicação de 96 horas. Macrófagos peritoneais WT e Dectina-1^{-/-} foram plaqueados 5×10^4 células/poço. As células foram incubadas overnight, tratadas com $40 \mu\text{g/ml}$ de rP21 no tempo de 96 horas e desafiadas com TCTY, na proporção de 5:1 (parasita:célula). Após o tempo foram fixadas e coradas com Giemsa. As diferenças significativas foram determinadas por One-way ANOVA.

No tempo de 96 horas, foi visualizada uma diminuição significativa no número de parasitas nas células infectadas sem dectina e tratadas ou não com rP21 (Figura 8) quando comparadas com as células Dectina^{-/-}, confirmando participação e a importância da rP21 no processo de multiplicação celular de *T. cruzi* e sugerindo que processos ativados pela sinalização via dectina-1 possam favorecer a multiplicação intracelular por *T. cruzi*. Essa possibilidade precisa ser melhor investigada em estudos posteriores.

4.4 Menor parasitismo e menor infiltrado leucocitário encontrado em animais nocautes para Dectina-1

Os experimentos in vitro mostraram que a deficiência na expressão de Dectina-1 provoca menor invasão celular do parasita com menor taxa de multiplicação intracelular quando comparado com macrófagos selvagens infectados. Vale a pena ressaltar que os resultados sugerem que a rP21 apresenta sua atividade biológica de forma independente da expressão do receptor Dectina-1. Dessa forma, realizamos experimentos in vivo em

animais selvagens e nocautes em Dectina-1 tratando ou não com rP21 para verificarmos em amostras de tecido cardíaco se existiria correlação com os achados *in vitro*. Análises qualitativas das amostras sugeriram que os animais nocautes em Dectina-1 tratados ou não com rP21 tiveram menor parasitismo (ninhos de amastigotas) e menor infiltrado leucocitário (Figura 9). O fato de os animais nocautes apresentarem uma proporção menor de ninhos de amastigota corrobora nossos achados *in vitro* e estão diretamente relacionados com o menor número de leucócito presentes nos tecidos. Assim, podemos sugerir que o receptor Dectina-1 pode figurar como uma importante molécula durante a interação *T. cruzi*-célula hospedeira para favorecer a infecção pelo parasita e que novos estudos voltados a antagonizar os efeitos desse receptor podem figurar como estratégias importantes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o controle do parasitismo durante a fase aguda da doença.

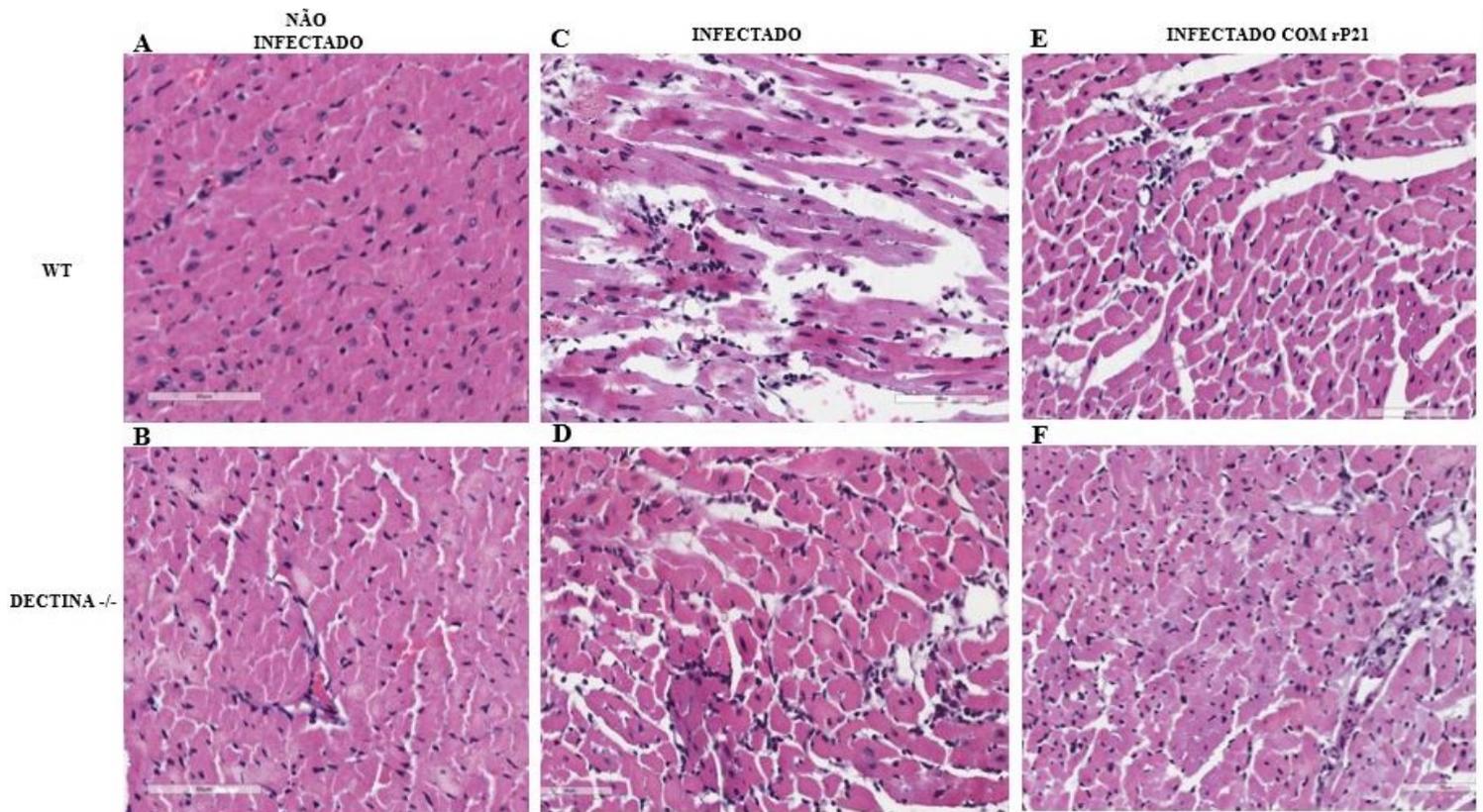


Figura 9. Análises histológicas cortes do coração. Lâminas contendo cortes dos corações dos animais e coradas com hematoxilina-eosina foram scaneadas pelo scanner de lâminas.

5 CONCLUSÃO

Concluimos que mecanismos ativados pela P21 parecem ser independentes dos mecanismos ativados pelo receptor Dectina -1, além disso, Dectina -1 vimos também que atividade importante no processo de infecção por *T. cruzi*, uma vez que em sua ausência há uma menor invasão e multiplicação dos parasitas e novos estudos voltados a antagonizar os efeitos desse receptor podem figurar como estratégias importantes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o controle do parasitismo durante a fase aguda da doença.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. P.; MARIN NETO, J.A.; PAOLA, A.A.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G.M.; BACAL, F.; BOCCHI, E.A.; ALMEIDA, D.R.; FRAGATA FILHO, A.A.; MOREIRA, M.D.A.C.; XAVIER, S.S.; OLIVEIRA JUNIOR, W.A.; DIAS, J.C. Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 96, p. 434-442, 2011.

ARIIZUMI, K.; GUO-LIANG SHEN, SOJIN SHIKANO, SHAN XU, ROBERT RITTER III, TADASHI KUMAMOTO, DALE EDELBAUM, AKIMICHI MORITA, PAUL R. BERGSTRESSER AND AKIRA TAKASHIMA. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 20157-20167, 2000.

AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L.E. Jr; FORNACIARI, G.;

ALLISON, M. A 9,000-year Record of Chagas's disease. PNAS, v. 101, p. 2034-2039, 2004.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. Methods in Enzymology, v. 162, p. 327-334, 1988.

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>

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

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. Cardiology Clinics, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.08.013>

BORGES, Bruna Cristina. A forma recombinante da proteína 21 de Trypanosoma cruzi interage com o receptor CXCR4 e diminui a invasão e proliferação de células tumorais de mama humanas. 2019. 60 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1265>

BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. Nature Reviews Immunology, v. 6, p. 33–43, 2006.

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

CHAMILOS, G. et al. Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of TH-17 responses. PLoS ONE, v. 5, e12955, 2010.

COSTA, Mylla Spirandelli da. Propriedades biológicas da proteína miosina-1 e do receptor dectina-1 na infecção in vitro por Trypanosoma cruzi. 2020. 93 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.711>

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

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

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

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

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. Signalling C-type lectins in antimicrobial immunity. *PLoS Pathogens*, v. 9, e1003417, 2013

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

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

GESSNER, M. A. et al. Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, v. 80, p. 410– 417, 2012.

GRINGHUIS, S. I. et al. Selective c-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal TH- 17 immunity by dectin-1 and dectin-2. *PLoS Pathogens*, v. 7, e1001259, 2011.

GRINGHUIS, S. I. et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature Immunology*, v. 13, p. 246-254, 2012.

GOODRIDGE, H. S; REYES, C. N. BECKER, C. A; KATSUMOTO, T. R; MA, J; WOLF, A. J; BOSE, N; CHAN, A. S; MAGEE, A.S, DANIELSON, M. E; WEISS A; VASILAKOS, J. P; UNDERHILL, D.M. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*, v. 472, p. 471-475, 2011.

GRINDLAY, J.H.; WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *American Medical Association Archives of Surgery*, v. 63, p. 288-297, 1951

HARDISON S. E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature Immunology*, v. 13, p. 817-822, 2012.

HIGASHINO-KAMEDA, M. et al. A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. *Inflammation Research*, v. 65, p. 235–244, 2015.

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

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. *The Journal Immunology*, ji1700258, 2017.

LOURES, F. V. et al. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 261, 2015.

MA, J. et al. Cutting edge: FYCO1 recruitment to dectin-1 phagosomes is accelerated by light chain 3 protein and regulates phagosome maturation and reactive oxygen production. *The Journal of Immunology*, v. 192, p. 1356-1360, 2014

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

MARTINS, Flávia Alves. Citocinas, citoesqueleto de actina e a P21 de *Trypanosoma cruzi* na multiplicação intracelular do parasito in vitro. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2015.345>

MARTINS, Flávia Alves. O papel da proteína rP21 na replicação parasitária in vitro e na infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. 2019. 98 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2090>

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; FERNANDES, M.C.; DA SILVA, C.V.; FERNANDES, A.B.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Sub-cellular Biochemistry*, v. 47, p. 101-109, 2008.

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

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>

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

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

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

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>

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

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

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, 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>

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

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

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

TEIXEIRA, Samuel Cota. Atividade antiangiogênica da forma recombinante da proteína 21 de *Trypanosoma cruzi*. 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2016.412>

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

TOTH, A. et al. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, p. 690–698, 2013

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

WANG, H. et al. C-type lectin receptors differentially induce th17 cells and vaccine immunity to the endemic mycosis of North America. *The Journal of Immunology*, v. 192, p. 1107–1119, 2014

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

VIRIYAKOSOL, S. et al. Dectin-1 is required for resistance to coccidioidomycosis in mice. *mBio*, v. 4, e00597–00512, 2013

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>

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

WEVERS, B. A. et al. Fungal engagement of the C-type lectin Mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. *Cell Host & Microbe*, v. 15, p. 494–505, 2014.

WILLMENT, J. A. et al. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Europe Journal Immunology*, v. 35, p. 1539-1547, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas' disease (American trypanosomiasis), 2017.



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	8 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